

Quantitative Bestimmung von Progesteron im Plasma mittels einer Proteinbindungsmethode

Progesteronkonzentrationen während der Infusion
von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ bei intrauterinem Fruchttod,
Missed abortion und Schwangerschaftsunterbrechungen

Dieter Berg

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554606_0028

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Josef ZANDER

QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PROGESTERON IM PLASMA MITTELS
EINER PROTEINBINDUNGSMETHODE

Progesteronkonzentrationen während der Infusion von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ bei intrauterinem Fruchttod, Missed abortion und Schwangerschaftsunterbrechungen.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dieter Berg

aus

München

Jahr

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Josef Zander

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. September 1974



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1. Methoden zur quantitativen Progesteron- bestimmung im peripheren Venenblut	2
2.1.1. Doppel-Isotopen-Derivat-Bildung	2
2.1.2. Gaschromatographie	2
2.1.3. Kompetitive Proteinbindung	3
2.1.4. Radioimmunologische Steroidbe- stimmung	3
3. MATERIAL UND METHODE	5
3.1. Material und Reagenzien	5
3.2. Methode	9
3.2.1. Grundlagen der Methode	9
3.2.2. Extraktion	13
3.2.3. Chromatographie	14
3.2.4. Proteinbindungsreaktion	15
3.2.5. Auswertung	16
3.3. Anmerkungen zu den einzelnen methodi- schen Schritten	17
3.3.1. Extraktion	17
3.3.2. Reinigung des Extraktes	18
3.3.3. Proteinbindungsreaktion	23
3.3.4. Adsorption durch Florisil	24
3.4. Zuverlässigkeit der Methode	27
3.4.1. Wiederfindung	27
3.4.2. Reagenzienleerwerte	27
3.4.3. Empfindlichkeit	28
3.4.4. Richtigkeit	29
3.4.5. Präzision	29
3.4.6. Spezifität	30
3.4.7. Praktische Bewährung der Methode	31

	Seite
4. ERGEBNISSE	32
4.1. Konzentration von Progesteron im Plasma während des Zyklus, in der Postmenopause und im Männerplasma	32
4.2. Konzentration von Progesteron im peri- pheren Plasma der Mutter während Prosta- glandin $F_{2\alpha}$ -Infusion	33
5. DISKUSSION	35
6. ZUSAMMENFASSUNG	41
7. LITERATURVERZEICHNIS	43
8. TABELLEN UND ABBILDUNGEN	
DANKVERMERK	
LEBENS LAUF	

1. EINLEITUNG

Die Bestimmung von Progesteron im peripheren venösen Blut ist für zahlreiche physiologische und klinische Studien in der Gynäkologie und Geburtshilfe von großer Bedeutung und gehört mit zu den wichtigen Hormonuntersuchungen im Bereich der Endokrinologie.

Seit Progesteron von BUTENANDT und Mitarbeitern (1934) isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt wurde, sind zahlreiche Methoden zur quantitativen Bestimmung des Hormons im Blut entwickelt worden. Während die klassischen biologischen Verfahren eine mangelhafte Spezifität und die photometrischen Bestimmungen eine relativ geringe Empfindlichkeit aufwiesen, wurden in neuerer Zeit Methoden ausgearbeitet, die eine Progesteronbestimmung auch bei so niedrigen Konzentrationen ermöglichen, wie sie im peripheren Blut der Frau während des Zyklus vorkommen.

2. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

2.1. Methoden zur quantitativen Progesteronbestimmung im peripheren Venenblut

2.1.1. Doppel-Isotopen-Derivat-Bildung

Prinzip:

Die unbekannte Menge Progesteron wird in ein radioaktiv markiertes Progesteronderivat übergeführt. Nach der Reinigung eines solchen Derivates ist die restliche Aktivität proportional der Masse an Progesteron oder seines Derivates. Zur Verbesserung der Genauigkeit und Präzision wird zusätzlich eine bestimmte Menge von radioaktiv markiertem Progesteron zugesetzt, um für Verluste während der Extraktion und Reinigung korrigieren zu können. Dabei ist es notwendig, daß das Isotop des Progesteronderivates ein anderes Energiespektrum als das Isotop zur Wiederfindungsbestimmung hat (Van der MOLEN & AAKVAAG, 1967).

Nachdem WOOLEVER & GOLDFIEN (1963) zuerst eine Doppel-Isotopen-Derivat-Methode zur Progesteronbestimmung im Plasma beschrieben haben, wurde von RIONDEL et al. (1965) eine modifizierte Methode angegeben, die eine Empfindlichkeit von 2 ng erreichte und die Progesteronmessung im Plasma von nichtschwangeren Frauen ermöglichte.

2.1.2. Gaschromatographie

Die Verwendung der Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektoren ermöglichte Progesteronbestimmungen in der Größenordnung von 100 - 10 ng (YANNONE et al., 1964, LUISI et al., 1965, LURIE et al., 1966)

Während diese Methoden gut zur Messung von Progesteronkonzentrationen bei schwangeren Frauen geeignet waren, konnten durch die Verwendung des Elektroneneinfangdetektors noch geringere Mengen bestimmt werden (Van der MOLEN & GROEN, 1965). Das Verfahren beruht auf folgendem Prinzip:

Die unbekannte Menge Progesteron kann nach Extraktion aus dem Plasma, 20- β -Reduktion, Bildung eines geeigneten Halogenderivates (hier das Monochloracetat von 20 β -Dihydroprogesteron) und entsprechenden Reinigungsschritten durch Gaschromatographie mit Hilfe des Elektroneneinfangdetektors quantitativ nachgewiesen werden. Van der MOLEN & GROEN geben eine Empfindlichkeit ihrer Methode von etwa 5 ng Progesteron an.

2.1.3. Kompetitive Proteinbindung

Diese Methode zur quantitativen Steroidbestimmung, deren Entwicklung und Prinzip im Kapitel 3.2.1. ausführlich dargestellt wird, hat gegenüber den oben genannten den Vorteil, zuverlässiger, einfacher und zeitsparender zu sein.

Bei Verwendung von menschlichem Plasma als Bindungsprotein kann eine Empfindlichkeit von etwa 0,2 ng erreicht werden. Progesteronbestimmungen sind damit in der Follikelphase des Zyklus oder auch im Männerplasma in Proben von 0,1 - 5 ml möglich.

2.1.4. Radioimmunologische Steroidbestimmung

Im Prinzip unterscheidet sich der Radioimmunotest von der kompetitiven Proteinbindungsmethode nur durch die Verwen-

dung eines künstlich erzeugten Antikörpers anstelle des natürlich vorkommenden Plasmaproteins im Bindungssystem. Als Antigene werden Steroid-Protein-Konjugate verwendet. Ihre Herstellung gelang zuerst durch ERLANGER et al. (1957) und GOODFRIEND & SEHON (1958).

Radioimmunologische Steroidbestimmungen wurden zuerst, nach Gewinnung geeigneter Antikörper, für Östrogen- (ABRAHAM, 1969) und Testosteronbestimmungen (MIDGLEY et al., 1969) entwickelt.

Die ersten radioimmunologischen Bestimmungsmethoden für Progesteron wurden von ABRAHAM et al. (1971) und kurz darauf von FURUYAMA & NUGENT (1971) beschrieben. Die verwendeten Antikörper waren auf Grund zahlreicher Kreuzreaktionen mit anderen C-21-Steroiden relativ unspezifisch. Der Vorteil dieser Methoden gegenüber den Proteinbindungsmethoden scheint daher nur in einer etwas erhöhten Empfindlichkeit auf Grund der besseren Bindungseigenschaften des Antikörpers zu liegen.

Eine wesentliche Verbesserung wurde durch die Verwendung von Antikörpern erreicht, die mit einem Antigen induziert wurden, das durch Koppelung von Progesteron an Position C-11 mit Rinderalbumin gebildet wird. (LINDNER et al., 1972, NISWENDER & MIDGLEY, 1970). Die Spezifität dieser Antikörper ist so groß, daß für Routinebestimmungen auf eine chromatographische Reinigung des Extraktes verzichtet werden kann (De VILLA et al., 1972, YOUSSEFNEJADIAN et al., 1972, SPIELER et al., 1972).

Ein Antiserum dieser Art stand zum Zeitpunkt, als diese Arbeit entstand, noch nicht zur Verfügung. Die Untersuchungen wurden deshalb mit einer modifizierten kompetitiven Proteinbindungsmethode durchgeführt.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. Material und Reagenzien

Lösungsmittel

Dioxan und Toluol für Szintillationsmessungen wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Diäthyläther für die Spektroskopie (E. Merck, Darmstadt) wurde stets aus frisch geöffneten Flaschen entnommen.

Die übrigen organischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch frisch destilliert.

Für wässrige Lösungen und zur Reinigung des Florisils wurde Aqua pro injectione (B. Braun, Melsungen) verwendet.

Steroide

1. 4-¹⁴C-Progesteron (Spezifische Aktivität = S.A. 61,0 mC/mMol)
2. 1,2-³H-Progesteron (S.A. 41,0 C/mMol)
3. 7-³H- 17 α -Hydroxy-progesteron (S.A. 14,8 C/mMol)
4. 4-¹⁴C- 17 α -Hydroxy-progesteron (S.A. 61,0 mC/mMol)
5. 1,2-³H- 20 α -Dihydroprogesteron (S.A. 50,3 C/mMol)
6. 1,2-³H-Corticosteron (S.A. 44,0 C/mMol)
7. 4-¹⁴C-Testosteron (S.A. 58,8 mC/mMol)
8. 4-¹⁴C- 20 β -Dihydroprogesteron wurde durch Reduktion von 4-¹⁴C-Progesteron (S.A. 61,0 mC/mMol) mittels 20 β -Steroiddehydrogenase nach der Methode von HENNING & ZANDER (1962) hergestellt.
9. Δ_4 -Pregnen-3,20-dion (Progesteron)
10. 21-Hydroxy- Δ_4 -pregnen-3,20-dion (Desoxycorticosteron)

Die Steroide 1-4 wurden von Amersham Buchler GmbH, Braunschweig, die Steroide 5-7 von New England Nuclear bezogen.

Alle nicht radioaktiv markierten Steroide wurden von Merck AG, Darmstadt erworben.

Sämtliche Steroide wurden entweder durch Celite-Säulenchromatographie oder Dünnschichtchromatographie gereinigt und in regelmäßigen Abständen auf Reinheit geprüft.

Florisil und Sephadex LH-20

Vor Gebrauch wurde Florisil^R (Magnesium-Trisilikat reinst, Korngröße 60 - 100 mesh) in einem Becherglas in Aqua pro injectione aufgeschüttelt. Der Überstand wurde nach Absetzen des Florisils dekantiert. Dieses Verfahren wurde sooft wiederholt bis der Überstand nach dem Aufschütteln klar blieb (3 - 20 mal).

Das Florisil wurde dann bei 110°C zwölf Stunden getrocknet und im Exsiccator aufbewahrt.

Sephadex LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Geräte

Automatische Pipetten

Eppendorf Mikroliterpipetten

Biopetten, Schwarz Bio Research, Orangeburg U.S.A.

Supermixer (Lab Line Inst., Ill. U.S.A.)

Zur Florisilzugabe diente ein gläserner Löffel mit 80 mg Fassungsvermögen, wie er bei MURPHY (1967) beschrieben wurde.

Zur Reinigung der Glaswaren wurde folgendes Verfahren konsequent eingehalten: Alle wiederholt verwendeten Glaswaren wurden nach Gebrauch mindestens 12 Stunden in eine 3% RBS-50-Lösung gelegt und dann gründlich nachgespült. Unmittel-

bar vor Wiederverwendung wurden sie zuerst mit Aqua dest. und dann mit Methanol p.a. nochmals sorgfältig gewaschen. Die Einweggläser zur Proteinbindungsreaktion wurden vor Gebrauch ebenfalls in Aqua dest. und danach in Methanol p.a. gereinigt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Bindungsprotein

Als Bindungsprotein wurde Plasma von einer gesunden jungen Frau verwendet, die vor der Blutentnahme in der präovulatorischen Phase des Zyklus über einen Zeitraum von 8 Tagen täglich 0,1 mg Äthinylöstradiol eingenommen hatte. Blut wurde aus einer Armvene in heparinisierte Röhrchen entnommen, zentrifugiert und das Plasma in Portionen zu 1 ml bei einer Temperatur von -15°C gelagert.

Zur Proteinbindungsreaktion wurden $1,9\text{ }\mu\text{C}$ ($1,2\text{-}^3\text{H}$)-Corticosteron in $25\text{ }\mu\text{l}$ Äthanol in einen Meßkolben mit Schliffstopfen pipettiert und unter N_2 eingedampft. Nach Auffüllen des Kolbens mit Aqua pro injectione auf 50 ml wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ Plasma als Bindungsprotein zugegeben. Der Meßkolben wurde verschlossen und mit der Hand etwa drei Minuten vorsichtig geschüttelt. Die Lösung wurde dann im Kühlschrank aufbewahrt und an den zwei darauffolgenden Tagen verwendet. Die Bindungskapazität der Proteinlösung betrug bei dieser Verdünnung durchschnittlich 73% des zugesetzten Corticosterons und änderte sich im Laufe von circa 6 Wochen nicht.

Biologisches Material

Die Proben zur Progesteronbestimmung während des Menstruationszyklus wurden von gesunden freiwilligen Versuchspersonen entnommen. Vom ersten bis zehnten Tag wurde die Ent-

nahme jeden zweiten Tag, danach täglich in der Zeit zwischen 12 und 13 Uhr vorgenommen. Bei den beiden Versuchspersonen handelte es sich um zwei gesunde Frauen im Alter von 32 und 41 Jahren mit einer Zyklusdauer zwischen 28 und 30 Tagen.

Weitere Blutproben zur Bestimmung von Progesteron wurden in regelmäßigen Zeitabständen während einer Dauerinfusion von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (Formel siehe Abbildung 1) von Patientinnen entnommen, die sich wegen Missed abortion*, intrauterinem Fruchttod, Blasenmole oder zur Schwangerschaftsunterbrechung in Behandlung befanden. Die Patientinnen wurden in 3 Gruppen eingeteilt (Siehe Tabellen 1-3):

Gruppe I : 2 Patientinnen mit intrauterinem Fruchttod in der 40.bzw. 43. Schwangerschaftswoche

Gruppe II : 12 Patientinnen mit Missed abortion in der 14.-33. Schwangerschaftswoche

Gruppe III: 3 Patientinnen mit intakter Gravidität in der 17. und 18. Schwangerschaftswoche und 1 Patientin mit Blasenmole

Die Patientinnen der Gruppe I erhielten Infusionen von 5 μg $\text{PGF}_{2\alpha}$ pro ml 5% Glucoselösung, die übrigen Patientinnen erhielten Infusionen mit 50 μg $\text{PGF}_{2\alpha}$ /ml. Zu Beginn wurden 0,5 ml/min infundiert. Je nach Erfolg und Verträglichkeit wurde halbstündig um 0,5 ml/min gesteigert. Einzelheiten bezüglich Gesamtdosis und Infusionsdauer ergeben sich aus den Tabellen 1-3. Zusätzlich wurden Dolantin, Valium und Paspertin in üblicher Dosierung verabreicht.

Mit Ausnahme von vier Patientinnen wurde regelmäßig eine Paracervikalblockade (Bupivacain) z.T. wiederholt gelegt.

Probennahme: Die Blutproben wurden aus den Armvenen mit

* darunter versteht man die wochen- bis monatelange Retention einer abgestorbenen, unreifen Frucht in der Gebärmutter

10 ml Kunststoffspritzen der Firma Sarstedt, Nümbrecht, (Monovette, mit Ammoniumheparinat präpariert) entnommen und anschließend zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und bei -15°C bis zur Verwendung eingefroren aufbewahrt.

3.2. Methode

3.2.1. Grundlagen der Methode

Die Bestimmung von Steroidhormonen mittels steroidbindender Plasmaproteine geht auf ausgedehnte Untersuchungen von MURPHY zurück. Sie beschreibt 1963 eine Methode zur Bestimmung von Corticoiden unter Verwendung des Transcortins. 1967 befaßt sie sich eingehend mit der Anwendung der kompetitiven Proteinbindungsmethode für Micro- und Ultramicrobestimmungen verschiedener Steroide in Körperflüssigkeiten. Die Methode beruht auf folgendem Prinzip:

Zu einem "in vitro"-System, das freies, Tritium-markiertes Corticosteron, freies CBG* und an CBG gebundenes ^3H -Corticosteron in einem Fließgleichgewicht enthält, wird Progesteron zugegeben. Progesteron konkurriert neben dem ^3H -Corticosteron um Bindungsstellen am Transcortin. Es stellt sich ein erneutes Fließgleichgewicht ein, wobei jetzt ein Teil der vorher vom Corticosteron besetzten Bindungsstellen vom Progesteron eingenommen wird. Je mehr Progesteron zugegeben

*Cortisol bindendes Globulin, auch Transcortin genannt (SEAL & DOE, 1966), ein Protein der α_1 -Globulinfraktion des Serumproteins, das Cortisol und verschiedene andere Steroide, darunter auch Progesteron und Corticosteron reversibel bindet.

wird, umso weniger Corticosteron wird an das Protein gebunden. Da diese Verdrängung über einen bestimmten Bereich proportional der zugegebenen Menge von Progesteron ist, kann man nach Entfernung der freien Steroide aus der Lösung durch Messung des gebundenen, radioaktiv markierten Corticosterons und Vergleich mit einer Standardkurve die unbekannte Menge des zugegebenen Progesterons bestimmen (Abbildung 2).

Die Abtrennung der proteingebundenen von den freien Steroiden wurde anfangs mit zeitraubenden Dialyseverfahren vorgenommen (MURPHY et al., 1963). Ein wesentlicher Fortschritt wurde durch Verwendung geeigneter Adsorbentien erreicht (Fuller's Erde, Florisil, Dextran beschichtete Aktivkohle), die ebenfalls von MURPHY (1967) eingehend auf ihre Verwendungsfähigkeit untersucht wurden.

Die erste genaue Darstellung einer kompetitiven Proteinbindungsmethode zur Messung von Progesteron geben NEILL et al. (1967) an:

Progesteron wird aus dem Plasma mit Petroläther extrahiert und durch Dünnschichtchromatographie von anderen Steroiden, die eine Affinität zu CBG besitzen, getrennt. Als Bindungsprotein wird Hundeplasma verwendet. Das ungebundene Progesteron und ^3H -Corticosteron wird durch Adsorption an Florisil aus der Lösung entfernt.

Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens liegt bei Progesteronkonzentrationen, wie sie im Plasma in der Follikelphase des Zyklus auftreten (0,2 ng).

YOSHINI & LIPSETT (1968) modifizierten die Methode, um Progesteron im Plasma während der Follikelphase, beim Mann und bei ovariectomierten Frauen zu messen. Dies war jedoch mit einem erheblichen zusätzlichen Aufwand verbunden. Nach Zugabe eines internen Standards zur Korrektur für Verluste wurde der Ätherextrakt gewaschen und ein zweiter chromatographischer Reinigungsschritt eingeführt. Die Trennung der freien von den gebundenen Steroiden wurde mittels einer

zeitraubenden Gelfiltration erreicht.

Die Einführung dieser Methode in anderen Laboratorien führte häufig zu erheblichen Schwierigkeiten, die sich in den zahlreichen Modifikationen äußern. Folgende Gründe spielten dabei eine wichtige Rolle. Es bestand der Wunsch, ein Verfahren zu finden, das spezifisch und zeitsparend sein sollte, um für Routinebestimmungen anwendbar zu sein. Diesen Forderungen stand die Tatsache gegenüber, daß das Bindungsprotein Transcortin gegenüber verschiedenen Steroiden ähnliche Affinität zeigt (REEVES et al., 1970) und man deshalb zu bestimmten zeitraubenden Reinigungsschritten gezwungen ist.

Grundsätzlich bestehen bei der kompetitiven Proteinbindungsmethode zwei Möglichkeiten, um Spezifität zu erreichen: Trennung der konkurrierenden Steroide durch Chromatographie, wobei die Dünnschichtchromatographie (NEILL et al., 1967, REEVES et al., 1970, RUBIN et al., 1970, PIZARRO, 1971, LUISI et al., 1971), die Säulenchromatographie (STONE et al., 1971, Celite-Säulen) und die Papierchromatographie (MARTIN et al., 1970) verwendet wurden, oder selektive Extraktion von Progesteron aus dem Plasma.

Versuche in dieser Richtung wurden von JOHANSSON (1969) mit einer bestimmten Sorte Petroläther unternommen, die nicht mehr zu erhalten ist (LURIE & PATTERSON, 1970). Diese Autoren benutzten zur "selektiven" Extraktion Petroläther und schlossen einen Waschvorgang mit Äthanol/Wasser an, um 17α -Hydroxy-, 20α -, 20β -Dihydro-Progesteron und Testosteron zu entfernen. DEMETRIOU & AUSTIN (1971) waren der Meinung, schon durch eine einfache Extraktion mit n-Hexan ließe sich eine für klinische Zwecke ausreichende Spezifität erreichen.

In neuerer Zeit wurde noch ein weiterer Weg zur Verbesserung der Spezifität beschritten. Während bisher als Plasmaprotein stets Transcortin verwendet wurde, wobei als

Quelle Hundeplasma (NEILL et al., 1967, MARTIN et al., 1970, RUBIN et al., 1970, LUISI et al., 1971), Männerplasma (LURIE & PATTERSON, 1970) sowie Plasma von ovariectomierten (YOSHIMI & LIPSETT, 1968, REEVES et al., 1970) oder mit Östrogenen, Gestagenen und Dexamethason behandelten Frauen (JOHANSSON, 1969, PIZARRO, 1971, STONE et al., 1971) diente, benützen SWAIN (1972) und PICHON & MILGROM (1973) PBP (Progesterone binding protein). PBP ist ein Protein, das im Plasma von Meerschweinchen nachgewiesen wurde. Im Vergleich mit Transcortin bindet es Progesteron selektiver und stärker. (DIAMOND et al., 1969, MILGROM et al., 1970, BURTON et al., 1971)

In den ersten Veröffentlichungen wurde nicht erwähnt, daß unbekannte Substanzen aus Reagenzien, Chromatographiematerial, Glaswaren und Plastikmaterial (MURPHY, 1970) Leerwerte und Meßergebnisse zum Teil ganz erheblich beeinflussten. Es wurden zahlreiche verschiedene Wege beschritten, um diese Schwierigkeiten zu überwinden:

RUBIN et al. (1970) reinigen alle verwendeten Glaswaren durch Erhitzen auf 800⁰F, REEVES et al. (1970) schlugen sorgfältiges Waschen mit Leitungswasser, Aqua dest., Äthanol und abschließend Äther vor.

Das Kieselgel, das zur Dünnschichtchromatographie verwendet wird, ist die zweite häufig genannte Quelle von Störfaktoren. STROTT & LIPSETT (1968) wuschen deshalb ihre beschichteten Chromatographieplatten sorgfältig und trockneten sie vor der Elution im Vakuum. MARTIN et al. (1970) und STONE et al. (1971) benützten Papierchromatographie bzw. Celitesäulenchromatographie. REEVES et al. (1970) korrigierten den unspezifischen Verdrängungseffekt unbekannter Substanzen aus dem Kieselgel durch Zusetzen einer "entsprechenden Menge" von Störfaktoren zu den Standardwerten. Die Störfaktoren gewannen sie quantitativ durch Elution

von leeren Dünnschichtplatten. YOSHIMI & LIPSETT (1968) schließlich reinigten das Eluat der Chromatographieplatten auf Aluminiumsilikat-Chromatographiesäulen. Einen ähnlichen Weg gingen PIZARRO & HUEZ (1971), die über gute Erfolge mit einer Reinigung des Eluats auf Sephadex LH-20-Säulen berichteten.

Bei der Einführung der kompetitiven Proteinbindungsmethode in unserem Labor wurde zuerst der Versuch unternommen, die von NEILL et al. (1967) und von JOHANSSON (1969) vorgeschlagenen Methoden nachzuvollziehen. Die auftretenden Schwierigkeiten führten, unter Ausnutzung vieler Vorschläge anderer Autoren, zu einer modifizierten Methode, die eine einfache und spezifische Bestimmung von Progesteron im Plasma bis zu einer unteren Meßbereichsgrenze von 0,2 ng/ml erlaubt.

3.2.2. Extraktion

Für eine Einzelbestimmung wurden je nach der erwarteten Progesteronkonzentration Plasmamengen zwischen 50 µl und 2 ml verwendet.

Das Plasma wurde in 8 ml Reagenzgläser (Höhe: 9,5 cm, mit spitzem Boden und Schliffstopfen) pipettiert und gegebenenfalls auf 1 ml mit Aqua pro injectione verdünnt. Nach Zugabe von 5 ml Diäthyläther wurden die mit Aqua dest. befeuchteten Schliffstopfen aufgesetzt. Alle Proben wurden paarweise auf einem Mixer eine Minute bei höchster Stufe geschüttelt. Nachdem sich die beiden Phasen wieder getrennt hatten, wurde der Äther mittels Pasteurpipetten möglichst vollständig in ein neues Reagenzglas abpipettiert und unter N₂ im Wasserbad bei 40°C eingedampft.

Diese Extraktion wurde in der beschriebenen Weise wiederholt.

3.2.3. Chromatographie des Extraktes

Die Reinigung des Ätherextraktes erfolgte mittels Säulenchromatographie. Als Sorptionsmittel diente Sephadex LH-20, wie im Prinzip schon von MURPHY (1970) vorgeschlagen. Das Trennungssystem stellt eine Modifikation des von CARR et al. (1971) ausgearbeiteten Chromatographiesystem S 10 dar.

Die Chromatographiesäulen (siehe Abbildung 3) haben eine Höhe von 11 cm, einen Durchmesser von 0,5 cm und fassen ein Volumen von 3,25 ml. Oben sind sie konisch erweitert und mit einem Mantelschliff NS 14/23 versehen. Sie besitzen einen kapillarförmigen Auslauf mit einer Länge von 1 cm.

Sephadex LH-20 (1,1 g pro Säule) wurde in ein Gemisch aus n-Hexan : Essigsäureäthylester : Methanol (85:5:10 v/v) in einem Rundkolben eingequollen, für einige Sekunden an eine Vakuumpumpe angeschlossen, um gelöstes Gas zu entfernen und dann über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tag wurde es mit einer Pasteurpipette in die Säulen blasenfrei eingefüllt, nachdem zuvor die Ausläufe der Säulen mit einem Rundfilter (Glasfaserpapier Whatman GF/A) abgedichtet worden waren.

Bis zur Verwendung wurden die Säulen verschlossen in einem großen Glaszylinder (Durchmesser 15 cm, Höhe 20 cm) mit eingeschliffenem Deckel senkrecht aufbewahrt, um ein Austrocknen der Säulen zu verhindern.

Vor der ersten Verwendung und nach jedem Gebrauch war es notwendig, die Säulen von Substanzen zu reinigen, die sich auf die Proteinbindungsreaktion störend auswirkten. Die Säulen wurden mit mindestens 100 ml des Lösungsmittelgemisches gewaschen, um eine vollständige Elution der an das Gel adsorbierten Störsubstanzen zu erzielen. Dieser Vorgang dauerte mehrere Stunden und wurde deshalb aus prak-

tischen Gründen über Nacht durchgeführt.

Die Säulen konnten bei Berücksichtigung der oben angeführten Maßnahmen über mehrere Monate ohne erkennbare Veränderung ihrer Eigenschaften verwendet werden.

Der trockene Rückstand des Ätherextraktes wurde in 100 μ l des oben beschriebenen Gemisches aus n-Hexan, Essigsäure-äthylester und Methanol gelöst und mit einer 100 μ l Eppendorfpipette auf die Säule aufgetragen. Zweimal wurde mit jeweils 100 μ l des Lösungsmittelgemisches sorgfältig nachgespült. Vor dem Auftragen der Probe und vor jedem Nachspülen wurde abgewartet, bis die Flüssigkeit vollständig in das Gel eingesickert war. Eluiert wurde mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch. Die ersten 3,5 ml des Eluats wurden verworfen, dann folgte in den nächsten 2 ml die Progesteronfraktion (siehe Abbildung 4). Sie wurde in Reagenzgläsern (11 x 75 mm) gesammelt und unter N_2 im Wasserbad bei 40°C zur Trockne eingedampft.

3.2.4. Proteinbindungsreaktion

Dieser Abschnitt der Methode wurde mit geringfügigen Änderungen so übernommen, wie er bei NEILL et al. (1967) beschrieben ist.

Standardlösungen (jeweils ca. 20 ml) mit 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 ng Progesteron/100 μ l Methanol wurden hergestellt und für den Zeitraum des Gebrauchs (ca. 2 Monate) verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt.

2 x je 100 μ l dieser Lösungen wurden in Reagenzgläser (75 x 11 mm) einpipettiert und unter N_2 eingedampft. Zu allen Proben wurde 1 ml der Bindungsproteinlösung gegeben. Um das Progesteron vollständig in Lösung zu bringen (NEILL et al., 1967) wurden die Reagenzgläser für 10 min in ein

Wasserbad von 40°C gestellt und danach einzeln 5 Sekunden auf einem Mixer bei Stufe zwei geschüttelt. Zur Bindungsreaktion wurden alle Gläser 15 Minuten in einem Eisbad bei 0°C stehengelassen.

Anschließend wurde jedes Reagenzglas nach Zugabe von 80 mg Florisil genau 30 Sekunden geschüttelt (Stufe 2,5) und wieder ins Eisbad zurückgestellt. Nach einer Minute, wenn sich das Florisil mit den adsorbierten Steroiden vollständig abgesetzt hatte, wurden 0,5 ml des Überstandes in ein Zählglas gefüllt und 10 ml Szintillationslösung zugegeben.

3.2.5. Auswertung

Messung der Radioaktivität

Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Tri-Carb-Szintillationszähler der Firma Packard (Modell 3380). Als Szintillationsflüssigkeit diente eine Lösung von PPO (2,5-Diphenyloxazol, 4 g) und Dimethyl-POPOP (2,2-p-Phenyl-bis(4-methyl-5-phenyloxazol), 400 mg) in 1 Liter Toluol.

Wässrige Proben wurden in folgender Lösung gezählt: 100 g Naphthalin, 7 g PPO, 0,3 g Dimethyl-POPOP in 1 Liter Dioxan.

Die Ausbeute betrug für Tritium durchschnittlich 45 % (in Toluol) bzw. 36 % (0,5 ml Wasser in Dioxan). Die Ausbeute für ^{14}C betrug 94 % (in Toluol). Alle Proben wurden genügend lange gemessen, um den Meßfehler innerhalb von ± 1 % zu halten.

Berechnung des Progesterongehalts der Proben

Die Radioaktivitätsmenge (cpm), die für die Standardproben im Szintillationszähler ermittelt worden waren, wurden in ein

Koordinatensystem (Abszisse: Progesteron in ng, Ordinate: ^3H -Corticosteron in cpm) eingetragen. Die Mittelwerte wurden verbunden und ergaben die Standardkurve (Abbildung 5). Eine Linearisierung der Standardkurve ist durch logit-Transformation möglich, wobei zeitraubende Rechnungen entfallen, wenn im Handel erhältliches logit-Papier verwendet wird. Durch Vergleich der Radioaktivität (cpm) in den unbekannten Proben mit den Standardwerten wurde die Progesteronmenge in ng abgelesen. Die in den Proben enthaltene Progesterongesamtmenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{X \times 100}{A \times B} = \text{ng Progesteron/ml Plasma}$$

X = aus der Standardkurve abgelesene Progesteronmenge

A = % Wiederfindung

B = Volumen der Plasmaprobe in ml

Die Ergebnisse der Bestimmungen wurden nur dann für zuverlässig gehalten, wenn die Progesteronmenge der Probe im linearen Bereich der Standardkurve lag, und die Doppelwerte nicht um mehr als 20 % von ihrem Mittelwert abwichen.

Zusammenfassend ist in Abbildung 6 eine stichwortartige Übersicht der einzelnen methodischen Schritte gegeben.

3.3. Anmerkungen zu den einzelnen methodischen Schritten

3.3.1. Extraktion

Ursprünglich wurde versucht, die Extraktion mit Petroläther nach der Methode von NEILL et al. (1967) durchzuführen. In Parallelversuchen, bei denen Plasma mit ca. 10.000 cpm ^3H -Progesteron jeweils mit der fünffachen Menge an Diäthyläther oder Petroläther (Kp. 40-60°C) extrahiert wurde, ergab sich eine Progesteronwiederfindung im Extrakt von

$96,2 \pm 2,1 \%$ ($n=30$) bei Verwendung von Diäthyläther gegenüber nur $85,4 \pm 5,3 \%$ ($n=20$) bei Petroläther.

Aufgrund der höheren und präziseren Wiederfindung mit Diäthyläther wurde dieser als Extraktionsmittel vorgezogen. Wegen der besseren Präzision konnte auf die Verwendung eines internen Standards verzichtet werden. Ein zusätzlicher Vorteil ist die Mitextraktion anderer Steroide durch Diäthyläther, so daß eine Bestimmung weiterer Steroide aus einer Probe möglich ist.

3.3.2. Reinigung des Extraktes

Vorversuche

Zur Reinigung des Diäthylätherextraktes wurde in Vorversuchen die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (Kieselgel GF 254, Merck, Darmstadt) verwendet. Der Extrakt wurde auf die in 2 cm breite Laufbahnen eingeteilte Platte aufgetragen und in dem Lösungsmittelsystem Benzol:Essigsäureäthylester 2:1 (v/v) chromatographiert. Die Zonen, die Progesteron enthielten, wurden durch am linken und rechten Rand der Platte mitchromatographierte Standardproben unter UV-Licht lokalisiert, das Kieselgel dieser Flächen wurde in Pasteurpipetten aufgesaugt, die an der Spitze mit Glaswolle verstopft waren. Mit 3 x 2 ml Diäthyläther wurde eluiert und das Eluat unter N_2 eingedampft. Der trockene Rückstand wurde zur Proteinbindungsreaktion verwendet.

Die Anwendung der Dünnschichtchromatographie führte bei Leerwertbestimmungen (1 ml Aqua dest.) zu extrem hohen "Progesteronwerten" zwischen 1,5 und 3,5 ng. Die unspezifischen störenden Substanzen stammten in der Hauptsache aus dem Kieselgel. Verschiedene Versuche zur Reinigung des Kieselgels führten zu keiner wesentlichen Verbesserung:

- Zweimaliges Waschen der Dünnschichtplatten durch aufstei-

gende Chromatographie in Diäthyläther

- Waschen des Kieselgels in Methanol vor Beschichtung der Platten
- 1 Stunde kochen in 1 % NaOH, filtrieren, mit heißem Wasser nachwaschen, 1/2 Stunde in 5 % H_2SO_4 kochen und bis zur Neutralität nachwaschen.

Auch eine Korrektur für Störfaktoren, wie sie von REEVES et al. (1970) vorgeschlagen wurde, war nicht möglich: Unterschiedlich große Flächen des Kieselgels ($1-5\text{ cm}^2$), die zur Reinigung zweimal in einem Diäthyläther- und einmal in einem Benzol:Essigsäureäthylester 2:1-System gelaufen waren, wurden von der Platte abgekratzt und mit 3 mal je 2 ml Äther eluiert. Das eingedampfte Eluat wurde der Proteinbindungsreaktion zugeführt.

Es wurden folgende Werte gefunden:

0,5 cm^2	Kieselgel	:	= 1,40 ng	"Progesteron-Äquivalente"
1,0 cm^2	"	:	= 1,55 ng	"
2,0 cm^2	"	:	= 1,40 ng	"
3,0 cm^2	"	:	= 1,25 ng	"
4,0 cm^2	"	:	= 3,30 ng	"
5,0 cm^2	"	:	= 2,25 ng	"

Chromatographie auf Sephadex LH-20

Als Alternative zur Dünnschichtchromatographie bot sich die Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 an, von der MURPHY (1970) und CARR et al. (1971) feststellten, daß damit bei Proteinbindungsmethoden sehr niedrige und konstante Wasserleerwerte zu erzielen sind.

Sephadex LH-20 ist ein hydroxypropyliertes, quervernetztes Dextran, das in polaren organischen Lösungsmitteln quillt. Eine chromatographische Trennung organischer Substanzen kann durch das Gel infolge des Molekularsiebeffektes (gro-

Die Moleküle können nicht in die Poren des Gels eindringen und erscheinen deshalb früher im Eluat), oder durch die Verteilung zwischen den Phasen des Lösungsmittelgemisches erreicht werden (Verteilungschromatographie).

Neben der Verwendbarkeit zur Chromatographie zahlreicher anderer fettlöslicher Substanzen eignet sich dieser spezielle Sephadextyp sehr gut zur Auftrennung von Steroiden. Bei Proteinbindungsmethoden zur quantitativen Bestimmung verschiedener Steroide wurde deshalb die Sephadex LH-20 Säulenchromatographie bereits früher zur Reinigung des Plasmaextraktes mit Erfolg eingesetzt (MIKHAIL et al., 1970, SWAIN, 1972, De VILLA et al., 1972, YOUSSEFNEJADIAN et al., 1972).

Wahl des Lösungsmittelsystems und der Säulengröße

Der Forderung nach optimaler Trennung von störenden Substanzen stand die Bedingung gegenüber, das Reinigungsverfahren durch möglichst kurze Dauer zeitlich praktikabel zu erhalten. Außerdem sollte das Elutionsvolumen der Progesteronfraktion möglichst gering sein, um Störsubstanzen der Proteinbindungsreaktion, die sich möglicherweise im Lösungsmittelgemisch befinden, weitgehend zu reduzieren.

Schließlich waren der Säulenhöhe praktische Grenzen gesetzt. Sie durfte nur so hoch gewählt werden, daß die kapillären Kräfte im Sorptionsmittel noch ausreichten, ein weiteres Durchlaufen des Lösungsmittels nach dessen vollständigem Einsickern in das Gel zu verhindern, um somit einem Trockenlaufen der Säule von oben her vorzubeugen. Dies ist von besonderer praktischer Bedeutung, da sich nur unter dieser Voraussetzung eine größere Anzahl von Säulen gleichzeitig bearbeiten läßt.

Mit der Auswahl des Lösungsmittelgemisches n-Hexan:Essigsäureäthylester:Methanol 85:5:10 (v/v) bei einer Säulen-

höhe von 11 cm und einem inneren Durchmesser von 0,5 cm wurden optimale Bedingungen erreicht. Unter diesen Voraussetzungen betrug die durchschnittliche Laufgeschwindigkeit der Säulen 0,25 ml pro Minute und das Elutionsvolumen der Progesteronfraktion 2 ml.

Untersuchung der Eigenschaften des Chromatographiesystems

Die Leistungsfähigkeit des Chromatographiesystems wurde mit 17α -Hydroxyprogesteron, Testosteron, 20α - und 20β -Dihydroprogesteron sowie mit 11-Desoxycorticosteron geprüft. Von diesen Steroiden ist bekannt, daß sie ähnliche polare Eigenschaften wie Progesteron besitzen. Mit Ausnahme von 20β -Dihydroprogesteron zeigen sie außerdem eine ausgeprägte Affinität zum Transcortin.

Jeweils zwei dieser Steroide wurden - unterschiedlich radioaktiv markiert (^{14}C und ^3H) - auf die Säule aufgetragen und chromatographiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen, eingedampft und die Aktivität im Szintillationszähler bestimmt. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 4 graphisch dargestellt.

20α -Dihydroprogesteron, Testosteron und 17α -Hydroxyprogesteron werden mit diesem Chromatographiesystem völlig, 20β -Dihydroprogesteron zu 94,6 % ($n = 43$) von Progesteron abgetrennt.

11-Desoxycorticosteron stand als radioaktiv markierte Substanz nicht zur Verfügung. Deshalb wurde in fünf Zusatzversuchen zu je 1 ml Plasma eines Pools (Postmenopausenplasma) 20 ng authentisches 11-Desoxycorticosteron zugegeben. Nach Extraktion und Chromatographie in der oben beschriebenen Weise wurde der Progesterongehalt dieser Proben mit der Proteinbindungsreaktion bestimmt. Es ergab sich ein Wert von $0,18 \text{ ng} \pm 0,04 \text{ ng}$. Die Progesteronkon-

zentration des Pools betrug $0,16 \text{ ng} \pm 0,035 \text{ ng}$. Eine chromatographische Trennung des 11-Desoxycorticosterons von Progesteron wurde daher angenommen.

Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung

Progesteron und 20α -Dihydroprogesteron trennten sich bei Verwendung der gleichen Säule über Wochen stets vollständig. Dabei erschien Progesteron bei einem Fraktionsvolumen von 0,5 ml immer in der 8. bis 11. Fraktion, 20α -Dihydroprogesteron in der 13. bis 16. Fraktion ($n=24$).

Probleme bei der routinemäßigen Anwendung

Der Dampfdruck der einzelnen Bestandteile des Lösungsmittelgemisches n-Hexan, Essigsäureäthylester und Methanol ist unterschiedlich groß. Praktische Probleme ergaben sich daher, wenn das Gemisch in weithalsigen, nicht verschließbaren Gefäßen aufbewahrt wurde. Bei Flüssigkeitsmengen von wenigen Millilitern kam es bereits in Minuten offensichtlich zu einer Änderung des Mischungsverhältnisses. Dies machte sich beim Auftragen der Lösung auf die Säule durch eine Änderung des Quellungszustandes des Gels und durch veränderte Trenneigenschaften der Säule bemerkbar.

Es wurde deshalb

- das Lösungsmittelgemisch in einem verschließbaren Gefäß mit engem Hals aufbewahrt
- auch während des Versuches dieses Gefäß zwischen den einzelnen Entnahmen verschlossen
- die Säule während des Trennungsvorgangs oben mit Alufolie abgedeckt
- darauf geachtet, daß die Säule nicht von unten her durch die Kapillare eintrocknen konnte, indem man die Spitze

der Säule in die Elutionsflüssigkeit eintauchen ließ, wenn das Lösungsmittel vollständig in das Gel eingesickert war und somit nicht mehr weiterlaufen konnte.

3.3.3. Proteinbindungsreaktion

Auswahl der geeigneten Verdünnung des Bindungsproteins

Um hinsichtlich Empfindlichkeit und Präzision der Methode eine optimale Konzentration des Bindungsproteins zu erhalten, wurden die Bindungseigenschaften des zur Verfügung stehenden Plasmas mit folgendem Test geprüft.

Prinzip: Mit Aqua pro injectione wurde eine Plasmaverdünnungsreihe zwischen 1:50 und 1:4000 hergestellt. Zu jeder Lösung wurde eine konstante Menge ^3H -markiertes Corticosteron zugesetzt und inkubiert wie beschrieben. Nach Adsorption mit Florisil wurde die prozentual von den einzelnen Verdünnungslösungen gebundene Menge Corticosteron bestimmt (Bindungsrate).

Durchführung: In sieben 15 ml Reagenzgläser wurden je 1,3 ng ^3H -Corticosteron (380.000 dpm, S.A. 44 C/mMol) in Äthanol pipettiert und unter N_2 eingedampft. Dann wurden je 10 ml der einzelnen Plasmaverdünnungen (1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000) zugegeben. Die ermittelten Bindungsraten sind in Abbildung 7 graphisch dargestellt.

Ein Abfall der gebundenen ^3H -Corticosteronmenge ist etwa bei einer Plasmaverdünnung von 1:250 zu verzeichnen. Bei einer weiteren Verdünnung des Plasmas ist folglich eine maximale Besetzung der Bindungsstellen des Proteins bei der gegebenen ^3H -Corticosteronkonzentration zu erwarten.

Zwei Gesichtspunkte spielen bei der Auswahl der geeigneten Plasmaverdünnung die wesentliche Rolle. Die Bindungs-

stellen des Proteins sollten einerseits möglichst vollständig besetzt sein, damit auch die Zufuhr von geringen Mengen Progesteron bereits zu einer erfassbaren Verdrängung von ^3H -Corticosteron führt. Zum anderen mußte eine hohe Plasmaverdünnung gewählt werden, um eine ausreichende Empfindlichkeit der Methode zu gewährleisten.

Deshalb wurde eine Plasmaverdünnung von 1:1000 bei einer Konzentration von 0,13 ng ^3H -Corticosteron (= 38.000 dpm) pro ml Proteinbindungslösung verwendet.

Mit den oben beschriebenen Proteinbindungslösungen wurde dreimal der gleiche Versuch im Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt. Keinerlei Änderungen der Bindungseigenschaften der Lösungen wurden festgestellt.

3.3.4. Adsorption durch Florisil

Zur Abtrennung der freien von den an das Bindungsprotein gebundenen Steroiden können als Adsorbentien Fuller's Erde, Florisil, sowie Dextran beschichtete Aktivkohle verwendet werden, wobei sich Florisil und Dextran beschichtete Aktivkohle speziell für die Trennung von gebundenem und ungebundenem Corticosteron eignen (MURPHY, 1967).

Bei der hier beschriebenen Methode wurde Florisil (Magnesium-Trisilikat) vorgezogen. Es läßt sich einfacher als die anderen Adsorptionsmittel verwenden, da es sich nach dem Schütteln der Proteinbindungslösung innerhalb weniger Sekunden am Boden absetzt. Ein Zentrifugieren, wie es zum Beispiel bei der Aktivkohle notwendig ist, entfällt.

In Vorversuchen wurden die Reagenzgläser mit je 1 ml einer Lösung von ^3H -Corticosteron in Wasser (20.000 dpm/ml) nach Florisilzugabe auf den Mixer bei (höchster) Stufe 6 30 Sekunden geschüttelt. Nach Absetzen des Florisils blieb der

Überstand trüb und nur etwa 75 % des freien Corticosterons waren von dem sedimentierten Florisil adsorbiert worden. Wenn aber bei Stufe 2,5 geschüttelt wurde, so war anschließend der Überstand klar und es waren nur noch $6,0 \pm 0,2$ % (S.D.) des eingesetzten ^3H -Corticosterons zu finden.

Offensichtlich wurden durch zu kräftiges Schütteln feinste Partikel des Mg-Trisilikats von den groben Körnchen abgelöst, die zwar das freie Corticosteron noch banden, sich aber nicht mehr am Boden absetzten.

Schwierigkeiten ergaben sich, als nach einigen Monaten anhand regelmäßiger Prüfungen festgestellt wurde, daß sich die Adsorptionseigenschaften der verwendeten Florisilcharge wesentlich verschlechtert hatten. Eine neue Charge erwies sich als völlig ungeeignet, da der Überstand auch nach mehr als zwanzigfachem Waschen in Aqua dest milchig trüb blieb. Eine weitere Packung konnte zwar durch reichliches Waschen in Aqua dest. von feinen Partikeln gereinigt werden, jedoch zeigte sie unzureichende Adsorptionseigenschaften. Erst nach längerem Suchen konnte wieder eine geeignete Charge gefunden werden, die dann aber bis zum Schluß der Untersuchungen unverändert blieb.

Diese Erscheinungen wurden bereits früher erwähnt (STROTT & LIPSETT, 1968, De SOUZA et al., 1970, HOFFMANN, 1972) und stellen eine nachteilige Eigenschaft des Florisils dar.

Störsubstanzen der Proteinbindungsreaktion

Nach Einführung der Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 war die wichtigste Ursache für Störsubstanzen der Proteinbindungsreaktion ausgeschaltet. Es wurde versucht noch weitere Quellen auszuschließen.

Die Chromatographiesäulen wurden auf folgende Weise getestet: 5 ml Eluat (n=8) einer frisch hergestellten Säule (die er-

sten 100 ml Eluat wurden verworfen), beziehungsweise 2 ml Eluat (n=21) einer bereits mehrmals zur Trennung verwendeten Säule (wobei nach der letzten Trennung 120 ml des Lösungsmittels über die Säulen gelaufen waren) wurden niedergetrocknet und der Rückstand der Proteinbindungsreaktion zugeführt. Der "Progesteron"-Mittelwert betrug bei beiden Säulen 0,02 ng und unterschied sich nicht signifikant von Null. Der höchste Einzelwert in diesen 29 Proben lag bei 0,12 ng.

In gleicher Weise wurden in Vorversuchen 5 ml Diäthyläther als Extraktionsmittel (n=8), die Plastikspitzen der Lippen- und Biopetten (n=10) und ungereinigte Einwegreagenzgläser auf Störsubstanzen getestet. Die Plastikspitzen wurden einen Tag lang in 2 ml des Lösungsmittelgemisches n-Hexan, Essigsäureäthylester, Methanol gelegt, das Lösungsmittel niedergetrocknet und der Rückstand mit der Proteinbindungsreaktion bestimmt. Alle gefundenen Mittelwerte unterschieden sich nicht signifikant vom Nullwert der Standardkurve (Äther: 0,03 ng, Höchstwert 0,12 ng, Plastikspitzen: 0,01 ng, Höchstwert 0,05 ng, Reagenzgläser: 0,01 ng, Höchstwert 0,10 ng).

Obwohl bei diesen Untersuchungen der einzelnen methodischen Schritte der Proteinbindungsreaktion keine signifikanten Störfaktoren zu erfassen waren, ist an Hand einzelner Meßwerte eine geringe Instabilität des ganzen Systems auffällig. Dies bestätigte sich auch im Verlauf der weiteren Experimente. So waren im Rahmen der routinemäßigen Untersuchungen von insgesamt 34 Probenserien 2 unbrauchbar, wobei sich trotz intensiver Überprüfung keine eindeutige Ursache für die Fehlbestimmung fand. Der einzig auffallende Umstand war, daß die Methode in beiden Fällen danach für mehrere Tage außer Kontrolle blieb, dann aber ohne weiteres Zutun plötzlich wieder reibungslos funktionierte.

Es wurden deshalb Kriterien für unbrauchbare Bestimmungen

eingeführt: Bei Wasserleerwerten von über 0,125 ng, Standardwerten, die auf der Standardkurve um mehr als 15 % vom Sollwert abweichen und Doppelwerten von Proben mit einer Abweichung von mehr als 20 % von ihrem Mittelwert wurde der gesamte Versuchsansatz wiederholt.

3.4. Zuverlässigkeit der Methode

3.4.1. Wiederfindung

Je 50 µl ^3H -Progesteron in Äthanol (ca. 10.000 cpm) wurden in Reagenzgläser, die zur Extraktion verwendet wurden, pipettiert und 1 ml Plasma eines Plasmapools zugegeben. Dieses Plasma wurde wie beschrieben extrahiert und der Extrakt auf der Säule chromatographiert. Die Progesteronfraktion des Eluats wurde direkt in einem Zählglas aufgefangen und die Radioaktivität nach Eindampfen und Zugabe von Szintillationslösung gezählt.

Die Wiederfindung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Wiederfindung} = \frac{\text{wiedergef. } ^3\text{H-Progesteron (cpm)}}{\text{Mittelwert der Kontrollwerte (cpm)}} \times 100$$

Es ergab sich eine Wiederfindung von $90,3 \pm 2,19 \%$ (S.D.) ($n=78$). Auf einen internen Standard zur Bestimmung der Wiederfindung wurde auf Grund der geringen Standardabweichung verzichtet.

3.4.2. Reagenzienleerwerte

Wasserproben (1 ml Aqua pro injectione) wurden, wie für Plasma beschrieben, zweimal mit Diäthyläther extrahiert, chromatographiert und mit der Proteinbindungsmethode gemessen. Es ergab sich ein Mittelwert von $0,07 \pm 0,05$ ng

(S.D.) entsprechend $VK = 71,5 \%$ ($n=42$, Tabelle 4).

3.4.3. Empfindlichkeit

Nach RICHTERICH (1971) entspricht die Empfindlichkeit einer Methode derjenigen Analysensubstanz, die bei einer Bestimmung gerade noch nachgewiesen werden kann.

In Bezug auf die Proteinbindungsmethode kann man dabei zwischen der Empfindlichkeit der Standardkurve und der Empfindlichkeit der gesamten Bestimmungsmethode unterscheiden (ABRAHAM, 1970).

Die Empfindlichkeit der Standardkurve läßt sich nach LIPSETT et al. (1970) als die 95 % Vertrauensgrenze (entspricht der doppelten Standardabweichung) des Nullwertes der Kurve definieren.

Die Standardabweichung des Nullwertes der Standardkurve der hier vorliegenden Methode betrug $\pm 0,015$ ng ($n = 41$). Daraus ergibt sich eine Empfindlichkeit der Standardkurve von 0,03 ng.

Die Empfindlichkeit der gesamten Bestimmungsmethode läßt sich unter Einbeziehung der Wiederfindung, des Reagenzienleerwertes und der Empfindlichkeit des Proteinbindungssystems, die wie oben angeführt aus der Empfindlichkeit der Standardkurve ersichtlich ist, ermitteln.

Auf Grund des Reagenzienleerwertes von $0,07 \pm 0,05$ ng (S.D.) und unter Berücksichtigung der Wiederfindung von 90,3 % wurde bei einer Bindungsplasmaverdünnung von 1:1000 eine Empfindlichkeit der gesamten Methode von 0,20 ng Progesteron im Plasma ermittelt.

3.4.4. Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde durch Zusatzversuche mit Progesteron beurteilt. Zu je 1 ml eines Pools von Postmenopausenplasma wurden bekannte Mengen Progesteron zugegeben (zwischen 0,25 ng und 2,50 ng). Aus den ermittelten Einzelbestimmungen wurden nach Abzug des Progesteronwertes des Postmenopausenplasmas die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten berechnet (Tabelle 5). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in einem Koordinatensystem, in dem auf der x-Achse die erwarteten Werte, auf der y-Achse die beobachteten Werte aufgezeichnet sind, eingetragen (Abbildung 8). Die Beziehung zwischen erwarteten und beobachteten Werten wurde statistisch durch die Berechnung der Regressionsgleichung erfaßt. Sie ergab $Y = 0,968 X + 0,05$ bei einer Streuung der einzelnen Punkte um die Gerade von $\pm 0,05$. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,998.

3.4.5. Präzision

Die Präzision einer Methode ergibt sich aus der Repetierbarkeit (Messung der Abweichung der Resultate innerhalb eines Versuchsansatzes, = Assay) und aus der Reproduzierbarkeit (Messung der Abweichung der Resultate derselben Probe, die an verschiedenen Tagen mit verschiedenen Geräten erfolgt (WHITBY et al., 1967, HUGHES, 1952, RICHTERICH, 1971).

Für die Repetierbarkeit ergab sich bei 19 Doppelbestimmungen ein Variationskoeffizient von 10,3 %. Für die Reproduzierbarkeit betrug der Variationskoeffizient bei 17 Doppelbestimmungen 15,2 %.

Der Variationskoeffizient dieser Doppelbestimmungen gleicher Proben wurde nach folgender Formel berechnet (SNEDECOR, 1952):

$$\text{Variationskoeffizient} = \frac{d^2}{2n}$$

mit

$$d = \left(\frac{\text{höherer Wert der Doppelbestimmung}}{\text{niederer Wert der Doppelbestimmung}} - 1 \right) \times 100$$

Der Progesterongehalt der Proben lag zwischen 0,25 und 2,50 ng pro ml.

3.4.6. Spezifität

Die Spezifität der Methode beruht auf der Eigenschaft des Transcortins nur wenige andere Steroide außer Progesteron mit hoher Affinität zu binden (REEVES et al., 1970) und auf der Abtrennung dieser um Bindungsstellen konkurrierenden Steroide von Progesteron durch Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20.

I. Ein Hinweis für die Spezifität dieser Methode ist der niedrige Reagenzienleerwert von 0,07 ng.

II. Die Spezifität einer Methode läßt sich ferner durch den Vergleich von Meßwerten verschiedener Methoden nachweisen, wenn die Meßwerte aus vergleichbarem Probenmaterial stammen (PIZARRO, 1971). Wie in Kapitel 4.1. und in Tabelle 6 gezeigt wird, liegen die Plasmawerte für Progesteron (Follikelphase, Lutealphase, Männerplasma, Postmenopausenplasma), die mit der hier beschriebenen Methode gemessen wurden im gleichen quantitativen Bereich wie die in der Literatur angegebenen Werte.

III. Aus einem Pool, der Plasma aus der Lutealphase des Zyklus enthielt, wurden 14 Proben (je 1 ml) entnommen und ihr Progesterongehalt mit der angegebenen Proteibindungsmethode bestimmt. In einem Parallelversuch dazu wurden 17 weitere Proben (je 10 ml) dieses Pools mit einer im Labor gut eingeführten gaschromatographischen Methode gemessen (Van der MOLEN & GROEN, 1965).

Es ergab sich bei der kompetitiven Proteinbindungsmethode ein Mittelwert von $12,6 \pm 1,40$ ng (S.D.) Progesteron/ml Plasma. Bei dem gaschromatographischen Verfahren wurde ein Mittelwert von $15,4 \pm 5,52$ ng (S.D.) errechnet.

3.4.7. Praktische Bewährung der Methode

Die Zuverlässigkeit einer Methode hängt im weiteren von ihrer praktischen Bewährung über einen längeren Zeitraum ab. Deshalb wurde zur fortlaufenden Kontrolle der Zuverlässigkeit an jedem Versuchstag eine Probe eines Kontrollserums mitbestimmt.

Herstellung des Kontrollserums: In 50 ml heparinisiertes Plasma von Frauen in der Postmenopause wurden 20 ng Progesteron (in 10 μ l Äthanol) zugegeben und ausreichend vermischt. Daraus wurden 48 Proben zu je 1 ml hergestellt, eingefroren und bei -25°C gelagert.

Kontrollkarte: Es wurde eine Kontrollkarte verwendet, wie sie von RICHTERICH & COLOMBO (1962) angegeben wurde (Abbildung 9). Die Bestimmung der ersten 6 Proben ergab einen Mittelwert von 0,51 ng Progesteron/ml Plasma. Dieser Wert wurde als Leitlinie auf der Kontrollkarte zusammen mit der ± 1 und ± 2 Standardabweichung (der tolerierte Variationskoeffizient wurde auf Grund der Präzisionsprüfung auf 15 % festgesetzt) eingetragen (Abbildung 9). Die an jedem Versuchstag gemessenen Werte der Proben des Kontrollserums wurden in diese Kontrollkarte eingetragen. Ist die Methode unter Kontrolle, so sollten 66 % der Werte innerhalb ± 1 s, 95 % der Werte innerhalb ± 2 s liegen (RICHTERICH, 1971). Dies war, wie aus Abbildung 9 ersichtlich ist, der Fall. Da der kontrollwert des 11. Versuchstages außerhalb der Leitlinie lag, wurde der gesamte Versuchsansatz wiederholt. Trotz dieser Ergebnisse ist jedoch darauf hinzuweisen, daß

für eine fundierte Aussage über die praktische Bewährung der Methode die Zahl der erfaßten Proben zu gering war.

Leistungsfähigkeit der Methode

Mit der beschriebenen Methode können 12 Proben zusammen mit einer Standardkurve aus 6 Doppelwerten von einer Arbeitskraft an einem Tag bestimmt werden.

4. E R G E B N I S S E

4.1. Konzentrationen von Progesteron im Plasma

1. Ein Männerplasma ergab in einer Fünffachbestimmung einen Progesteronmittelwert von $0,30 \pm 0,04$ ng/ml (S.D.)
2. In Plasmaproben von Frauen, die sich in der Follikelphase des Menstruationszyklus befanden (4. - 11. Tag) wurden Progesteronwerte zwischen 0,15 und 0,35 ng/ml gemessen. Mittelwert: 0,23 ng/ml (n=8).
3. In einem Pool, der Plasma von vierzig Frauen in der Lutealphase des Menstruationszyklus enthielt, wurde eine Progesteronkonzentration von $12,6 \pm 1,40$ ng/ml Plasma gemessen.
4. In zwei Plasmapools von 16 und von 9 Frauen, die sich in der Postmenopause befanden, wurde eine Progesteronkonzentration von $0,16 \pm 0,035$ ng/ml (n=8) bzw. $0,20 \pm 0,06$ ng/ml Plasma (n=5) ermittelt.
5. Bei zwei gesunden Frauen im Alter von 32 und 41 Jahren mit regelmäßigen, biphasischen Menstruationszyklen (Zyklusdauer 28 - 30 und 29 - 30 Tage) wurden die Veränderungen der Plasma-Progesteronkonzentration während eines ganzen Zyklus gemessen. Die Ergebnisse die-

ser Messungen sind in Abbildung 10 und 11, sowie in Tabelle 7 und 8 dargestellt. In diesen Abbildungen sind zusätzlich die Plasma-LH-Werte* sowie die Basaltemperaturkurve beziehungsweise der Zeitpunkt des Anstieges der Basaltemperatur vermerkt.

4.2. Konzentration von Progesteron im peripheren Plasma der Mutter während Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Infusion

Die Einteilung der 18 behandelten Patientinnen erfolgte wie in Kapitel 3.1. beschrieben entsprechend der klinischen Diagnose in drei Gruppen. Einzelheiten ergeben sich aus den Tabellen 1-3.

Klinischer Verlauf

Bei den Patientinnen der Gruppen I und III traten innerhalb der ersten zwei Stunden nach Infusionsbeginn Wehen ein. Die Infusionsdauer lag zwischen 2 und 13 Stunden. Bei zwei Patientinnen (Interruptiones) mußte die Infusion am folgenden Tag wiederholt werden. In allen Fällen kam es ohne weitere Maßnahmen zur Ausstoßung des Feten. Eine Blasenmole wurde in toto ausgestoßen.

Bei den Patientinnen der Gruppe II traten ebenfalls innerhalb der ersten zwei Stunden Wehen ein mit einer Ausnahme: Bei dieser Patientin war ein Endotoxinschock bei septischem Abort vorausgegangen. Am Tag nach der Prostaglandin-Infusion kam es jedoch zur spontanen Ausstoßung des Feten. Trotz regelmäßiger Wehen kam es bei zwei weiteren Patientinnen dieser Gruppe nicht zu einer genügenden Cervixeroöffnung. Bei diesen zwei Frauen erfolgte eine instrumentel-

* Die LH-Konzentrationen im Plasma wurden freundlicherweise von Herrn Dr.med. Rjosk bestimmt.

le Ausräumung, während es bei den übrigen 10 Patientinnen zur Ausstoßung kam.

Alle Einzelwerte der Progesteronbestimmung vor und während der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Infusion sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Bei den Patientinnen der Gruppen I-III wurde mit einer Ausnahme ein deutlicher Abfall des Progesteronspiegels im peripheren Plasma unter der Prostaglandin-Infusion beobachtet (Abbildung 12 und 13).

Nur im Fall 14 kam es zu keiner Verringerung der Plasmapro-gesteronkonzentration während der Infusion. Bei dieser Patientin lag ein Endotoxinschock bei septischem Abort vor. Gleichzeitig handelte es sich hier um den einzigen Fall, bei dem durch die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Infusion keine Wehen ausgelöst werden konnten.

Der prozentuale Abfall der Progesteronkonzentration beträgt, wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist, in allen Einzelfällen (außer Nr. 14) am Ende der Infusionszeit unabhängig vom Progesteron-Ausgangswert zwischen 20,0 und 52,9 Prozent des Ausgangswertes (Mittelwert: $34,3 \pm 10,2$ %). Dieser Abfall ist signifikant ($p < 0,01$).

Der Kurvenverlauf des prozentualen Progesteronabfalls war für alle drei Gruppen ähnlich. (Abbildung 15)

Die bis zur Ausstoßung des Uterusinhalts benötigte Prostaglandindosis war vom Ausgangswert des Plasmapro-gesteronspiegels vor der Infusion unabhängig.

Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der im Einzelfall verabreichten mittleren Prostaglandinkonzentration (darunter ist die verabreichte Gesamtdosis $\text{PGF}_{2\alpha}$ pro Infusionsdauer zu verstehen. Sie dient als Äquivalentwert für den im Plasma erreichten mittleren $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Spiegel) und der am Infusionsende erzielten prozentualen Verminderung

der peripheren Progesteronkonzentration. $r = 0,783$; $n=15$
 $p < 0,001$ (Abbildung 16).

Fall Nr. 14 liegt weit abseits von der Regressionsgeraden. Da bei dieser Patientin durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ keine Wehen induziert werden konnten, wurde der Wert bei der Korrelationsberechnung nicht berücksichtigt.

Auch die zwei Patientinnen mit intrauterinem Fruchttod (Fall 1 und 2) wurden in diese Korrelation nicht mit einbezogen, weil sie in Bezug auf die erforderliche Dosis und die Schwangerschaftsdauer eine Sonderstellung einnahmen.

5. DISKUSSION

Der Zweck der vorliegenden Arbeit war die Einführung einer zuverlässigen Methode zur Progesteronbestimmung auf der Basis der kompetitiven Proteinbindungsreaktion, wobei die Versuchsbedingungen so gewählt werden sollten, daß durch eine spätere Erweiterung zusätzlich auch 17α -Hydroxyprogesteron oder 20α -Dihydroprogesteron im gleichen Arbeitsgang gemessen werden könnten.

Kompetitive Proteinbindungsmethoden zur Messung von Progesteron, die auf eine chromatographische Reinigung des Extrakts verzichten und sich lediglich mit einer selektiven Extraktion von Progesteron aus dem Plasma begnügen (JOHANSSON, 1969, LURIE & PATTERSON, 1970, SWAIN, 1972, PICHON & MILGROM, 1973) können gut geeignet sein für klinische Zwecke, da eine hohe Zahl von Proben pro Tag bestimmt werden kann. Um eine optimale Zuverlässigkeit zu erreichen, ist jedoch ein chromatographischer Reinigungsschritt notwendig.

Die Extraktion des Plasmas mit Diäthyläther und die anschließende Chromatographie auf Sephadex LH-20 Säulen ist aus folgenden Gründen vorteilhaft: Eine sehr hohe und konstan-

te Wiederfindung, wie sie in keiner der in Tabelle 6 aufgeführten Arbeiten erreicht wird, macht die zeitraubende Einführung eines internen Standards überflüssig. Eine Bestimmung weiterer Steroide aus der gleichen Plasmaprobe (Testosteron, 17α -Hydroxyprogesteron) scheint möglich zu sein. Obwohl bei Verwendung der Dünnschichtchromatographie niedrigere Reagenzienleerwerte erzielt werden können, treten oft auch unerklärlich hohe Leerwerte auf (MARTIN et al., 1970). Diese Erscheinung wurde bei der Verwendung der Sephadex-Säulenchromatographie nicht beobachtet. Die Papierchromatographie, die ebenfalls zu konstant niederen Reagenzienleerwerten führt (MARTIN et al., 1970), erfordert einen hohen Zeitaufwand. Die Trennung von Progesteron auf einer Sephadex-Säule ist circa 20 Minuten nach Auftragen der Probe beendet, wobei ohne besondere Übung 12 Säulen gleichzeitig behandelt werden können. Schließlich sind die beschriebenen Säulen im Gegensatz zu Celite-Säulen (STONE et al., 1971, ABRAHAM et al., 1971) nach Reinigung mit 120 ml des Lösungsmittels wieder verwendbar. Der Arbeitsaufwand für ein Neupacken der Säulen entfällt. Diese Eigenschaft ist eine wichtige Voraussetzung für eine teilweise Automatisierung der Methode.

Ein Mangel der kompetitiven Proteinbindungsreaktion ist die ungenügende Spezifität und die zu Progesteron relativ niedrige Affinität des als Bindungsprotein verwendeten Transcortins. Bessere Eigenschaften in diesen beiden Punkten werden vom PBP, Progesteron bindendem Plasmaprotein des Meerschweinchens (MILGROM et al., 1970, DIAMOND et al., 1969) und von verschiedenen Antikörpern gegen Progesteron als Hapten beschrieben (ABRAHAM et al., 1971, FURUYAMA & NUGENT, 1971, LINDNER et al., 1972, NISWENDER & MIDGLEY, 1970, SPIELER et al., 1972, De VILLA et al., 1972). Eine Verbesserung der hier vorgeschlagenen Methode durch Austauschen des Bindungsproteins erscheint deshalb möglich. Dies würde eine leicht erhöhte Empfindlichkeit und eine

geringere Störanfälligkeit bewirken.

Ein tiefgreifender Fortschritt auf dem Gebiet der kompetitiven Proteinbindungsmethode ist jedoch nur durch die Erzeugung eines stabilen, für Progesteron spezifischen Antikörpers gegeben, wodurch eine chromatographische Reinigung des Extrakts überflüssig wird und eine einfache Methode in gleichem Maße für klinische wie für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung steht (SPIELER et al., 1972, De VILLA et al., 1972).

Die erreichten Reagenzienleerwerte liegen (Tabelle 4) im quantitativen Bereich vergleichbarer Proteinbindungsmethoden und sind den Werten von YOSHIMI & LIPSETT (1968) und REEVES et al. (1970) sehr ähnlich. Auffallend ist in diesem Zusammenhang, daß NEILL et al. (1967) einen Reagenzienleerwert von 0 angeben, HAGERMAN & WILLIAMS (1969) bei Anwendung dieser Methode jedoch einen Wert von $0,8 \pm 0,4$ ng messen. Die Reagenzienleerwerte, die mit radioimmunologischen Methoden erzielt wurden, sind insgesamt niedriger und weisen einen geringeren Grad von Streuung auf.

Empfindlichkeitsvergleiche sind nicht leicht zu ziehen, da verschiedene Definitionen der Empfindlichkeit existieren und bei der Wertung benutzt werden. Man kann jedoch feststellen, daß die in dieser Arbeit erreichte Empfindlichkeit der Methode (definiert als diejenige Menge Analysensubstanz, die gerade noch nachzuweisen ist) gut mit anderen Proteinbindungsmethoden übereinstimmt, die Empfindlichkeit radioimmunologischer Methoden jedoch um den Faktor 4-8 höher liegt.

Genauigkeit und Präzision entsprechen den allgemein erwarteten Anforderungen, die an eine routinemäßige Hormonbestimmungsmethode gestellt werden.

Es läßt sich deshalb zusammenfassend sagen, daß die hier beschriebene, modifizierte Proteinbindungsmethode für die Bestimmung von Progesteronkonzentrationen, wie sie im mensch-

lichen Plasma vorkommen, zuverlässig ist. Aufgrund der Zuverlässigkeitskriterien ist sie auch geeignet, so geringe Konzentrationsänderungen, wie sie in der periovulatorischen Phase bei der Frau auftreten, sicher zu erfassen. Die Methode gestattet es, mehr Proben/Tag zu bestimmen, als mit vergleichbar spezifischen Proteinbindungsmethoden. Eine Routineanwendung erscheint auf Grund der Kontrollversuche erfolgversprechend.

Die ermittelten Werte der Progesteronkonzentrationen im Männerplasma, im Plasma von Frauen in der Follikelphase und in der Lutealphase des Zyklus sowie in der Postmenopause stimmen mit den in Tabelle 6 aufgeführten Ergebnissen anderer Autoren gut überein.

Die Progesteronbestimmung im Plasma von zwei gesunden Frauen während eines ganzen Menstruationszyklus, die zur Bestätigung der biologischen Anwendbarkeit der Methode durchgeführt wurden, brachte hinsichtlich des Kurvenverlaufs der Progesteronkonzentration (Abbildung 10 und 11) Resultate, die zahlreichen früher berichteten Untersuchungsergebnissen sehr ähnlich sind (YOSHIMI & LIPSETT, 1968, JOHANSSON & WIDE, 1969, YUSSMAN & TAYMOR, 1970, PIZARRO, 1971). Bemerkenswert ist der in beiden Fällen beobachtete Anstieg der Progesteronkonzentration schon zur Zeit des LH-Peaks, der mit den Beobachtungen von JOHANSSON & WIDE, 1969, sowie YUSSMAN & TAYMOR, 1970, übereinstimmt, die dies für einen präovulatorischen Anstieg des Progesteronspiegels halten. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von YOSHIMI & LIPSETT, 1968, sowie von NEILL et al., 1967, die in den von ihnen gemessenen Zyklen keinen signifikanten Anstieg des Progesterons zum Zeitpunkt des LH-Gipfels fanden. Eine zeitliche Diagnose der Ovulation selbst wurde nicht durchgeführt.

Das Ergebnis der Progesteronbestimmung im peripheren Plasma von Frauen, die zur vorzeitigen Beendigung einer in-

takten Graviddtät Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Infusionen erhielten, steht in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen von CANTOR et al. (1972), die ebenfalls regelmäßig beim Auftreten von Wehen nach $PGF_{2\alpha}$ -Infusionen einen Progesteronabfall im peripheren Plasma feststellen konnten. Auch CSAPO et al. (1971) berichten in ihren Untersuchungen über einen Progesteronabfall bei Infusionen von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ bei Schwangerschaftsunterbrechungen. Jedoch fanden sie nur bei erfolgreichem Abort einen Progesteronabfall, nicht aber bei Patientinnen, bei denen nur Wehen ausgelöst werden konnten. Im Gegensatz dazu stellten SPEROFF et al. (1972) keinen signifikanten Progesteronabfall während der $PGF_{2\alpha}$ -Infusion zur Auslösung einer Interruptio fest. Dieses Ergebnis stimmt mit der Anschauung von WIKVIST et al. (1971) überein.

Die Progesteronverlaufskurven unter $PGF_{2\alpha}$ -Infusionen bei Missed abortion und intrauterinem Fruchttod, über die keine früheren Untersuchungen bekannt sind, unterscheiden sich nicht wesentlich von denen bei intakter Graviddtät, wenn man davon absieht, daß die absoluten Progesteronwerte vergleichsweise niedriger liegen. In beiden Fällen ist der Progesteronabfall ähnlich dem, wie er unter der normalen Geburt auftritt. Ob und in wie weit dies auf einen ähnlichen Mechanismus zurückzuführen ist, bleibt zunächst offen.

Auffallend ist jedoch der Befund, daß in den beobachteten Fällen die Progesteronkonzentration im peripheren Blut, praktisch unabhängig davon, ob die Schwangerschaft noch intakt ist und unabhängig von der Ausgangshöhe des Progesteronspiegels, unter verschiedenen hohen Dosen von $PGF_{2\alpha}$ prozentual annähernd gleich abfällt.

Der Befund, daß der prozentuale Progesteronabfall signifikant korreliert ist mit der verabreichten mittleren $PGF_{2\alpha}$ -Konzentration, bedarf der Kontrolle und weiterer Untersuchungen.

Interessant erscheint es, daß im einzigen Fall, in dem

es zu keiner Wehenauslösung kam, der Progesteronspiegel während der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Infusion unverändert hoch blieb.

Eine Deutung dieser Ergebnisse hinsichtlich des Wirkungsmechanismus des Prostaglandins $\text{F}_{2\alpha}$ bei der Wehenauslösung ist auf Grund der vorliegenden Daten noch nicht möglich.

Der eigentliche Mechanismus, durch den $\text{PGF}_{2\alpha}$ Wehen oder einen Abort induziert, ist weitgehend unbekannt. Die vorliegenden experimentellen Ergebnisse geben nur Hinweise, die zum Teil auch widersprüchlich sind.

Aus Tierversuchen läßt sich der Schluß ziehen, daß $\text{PGF}_{2\alpha}$ beim hysterektomierten Meerschweinchen (BLATCHLEY & DONOVAN, 1969), beim Rhesusaffen (KIRTON et al., 1970), bei pseudograviden Ratten (PHARRIS & WYNGARDEN, 1969) sowie beim Schaf (Mc CRACKEN et al., 1970) eine luteolytische, das heißt eine zur Rückbildung des Corpus luteum führende Wirkung hat. Beim Menschen liegen über einen luteolytischen Effekt des $\text{PGF}_{2\alpha}$ keine gesicherten Aussagen vor (WIKVIST et al., 1971, LE MAIRE & SHAPIRO, 1972, JEWELEWICZ et al., 1972, LEHMANN et al., 1972, JONES & WENTZ, 1972). Die Hemmung der Steroidproduktion im Corpus luteum graviditatis könnte nur ganz zu Beginn der Schwangerschaft eine entscheidende Rolle bei der Auslösung eines Aborts spielen. Die Hypothese einer direkten kontraktionsauslösenden Wirkung am Myometrium durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ leiten BYGDENAN et al. (1970) aus den Ergebnissen ihrer Untersuchungen am schwangeren menschlichen Uterus sowie aus Tierversuchen ab.

Schließlich wird auch eine Beeinflussung der funktionellen Integrität der fetoplazentaren Einheit als mögliches Wirkungsprinzip vermutet. Dabei könnte eine Beeinträchtigung der Plazentafunktion durch einen vasokonstriktorischen Effekt des $\text{PGF}_{2\alpha}$ (JEWELEWICZ et al., 1972, CANTOR et al., 1972) auf die uterinen oder plazentaren Gefäße oder durch eine Ruhetonuserhöhung der Uterusmuskulatur hervorgerufen werden (CSAPO et al., 1971).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine modifizierte kompetitive Proteinbindungsmethode zur Bestimmung von Progesteron im peripheren Plasma beschrieben. Nach Extraktion des Plasmas mit Diäthyläther wird der Extrakt auf Sephadex-LH-20-Chromatographiesäulen gereinigt, bevor der Progesterongehalt mit der Proteinbindungsreaktion bestimmt wird. Die beschriebene Methode hat eine Empfindlichkeit von 0,20 ng Progesteron. Richtigkeit, Präzision und Spezifität entsprechen in der Zuverlässigkeit anderen Proteinbindungsmethoden zur Progesteronbestimmung.

Die biologische Anwendbarkeit wurde nachgewiesen bei Messungen der Plasmaprogesteronkonzentrationen von zwei Frauen während eines gesamten Menstruationszyklus, sowie bei der Bestimmung von Progesteronwerten im Follikelphasenplasma (0,15-0,35 ng/ml), Lutealphasenplasma (Mittelwert: 12,6 ng/ml), im Plasma von Frauen in der Postmenopause (0,16-0,20 ng/ml) und im Männerplasma (0,30 ng/ml).

18 Patientinnen mit intrauterinem Fruchttod, Missed abortion in der 14.-33. Woche, Blasenmole oder intakter Gravidität in der 17. und 18. Schwangerschaftswoche wurden mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Infusionen zur Weheneinleitung behandelt.

Mit einer Ausnahme traten innerhalb der ersten zwei Stunden nach Infusionsbeginn Wehen auf. Bei Progesteronbestimmungen im Plasma, die vor Infusionsbeginn und dann in etwa 2-stündigem Abstand erfolgten, wurde mit Ausnahme von einem Fall, in dem es zu keiner Wehenauslösung kam, ein signifikanter Abfall des Progesteronspiegels während der Infusion festgestellt. Der Abfall lag unabhängig von der Höhe des Ausgangswertes ($\approx 100\%$) zwischen 20 und 50 Prozent.

Während offenbar kein Zusammenhang zwischen der Prostaglandindosis/Zeit und dem absoluten Progesteronabfall bestand

fand sich eine signifikante Korrelation zwischen der im Einzelfall verabreichten mittleren Prostaglandinkonzentration und der bis zum Infusionsende erzielten prozentualen Verminderung der peripheren Progesteronkonzentration.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abraham, G.E.

Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β
J.clin.Endocr. 29, 866 (1969)

Abraham, G.E.

In: Steroid assay by protein binding
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproduc-
tive Endocrinology, 2 nd Symposium
Acta endocr. (Kbh) Suppl. 147, 58 (1970)

Abraham, G.E., Swerdloff, R., Tulchinsky, D., Odell, W.D.,
Radioimmunoassay of plasma progesterone
J.clin.Endocr. 32, 619 (1971)

Blatchley, F.R., Donovan, B.F.,

Luteolytic effect of prostaglandin in the guinea
pig
Nature 221, 1065 (1969)

Bodley, F.H., Chapdelaine, A., Flickinger, G., Mikhail, G.,
Yaverbaum, S., Roberts, K.D.,

A highly specific radioimmunoassay for progesterone
using antibodies covalently linked to arylamine-
glass particles
Steroids 21, 1 (1973)

Burton, R.M., Harding, G.B., Rust, N., Westphal, U.,

Steroid-protein interactions XXIII. Nonidentity of
cortisol-binding globulin and progesterone-binding
globulin in guinea pig serum
Steroids 17, 1 (1971)

- Butenandt, A., Westphal, U., Cobler, H.,
Über einen Abbau des Stigmasterins zu Corpus luteum-
wirksamen Stoffen. Ein Beitrag zur Konstitution des
Corpus-luteum-Hormons
Ber.deut.chem.Ges. 67, 1611 (1934)
- Bygdeman, M., Kwon, S.U., Mukherjee, I., Roth-Brandel, U.,
Wiqvist, N.,
The effect of prostaglandin F compounds on the con-
tractility of the human pregnant uterus
Am.J.Obstet.Gynec. 106, 567 (1970)
- Cantor, B., Jewelewicz, R., Warren, N., Dyrenfurth, I., Patner, A.,
Vande Wiele, R.L.,
Hormonal changes during induction of midtrimester
abortion by prostaglandin F_{2α}
Am.J.Obstet.Gynec. 113, 607 (1972)
- Carr, B.R., Mikhail, G., Flickinger, G.L.,
Column chromatography of steroids on Sephadex LH-20
J.clin.Endocr. 33, 358 (1971)
- Csapo, A.I., Sauvage, J.P., Wiest, W.G.,
The efficacy and acceptability of intravenously
administered prostaglandin F_{2α} as an abortifacient
Am.J.Obstet.Gynec. 111, 1059 (1971)
- Demetriou, J.A., Austin, F.G.,
A rapid competitive protein-binding assay for plasma
progesterone
Clin.Chim.Acta 33, 21 (1971)

- De Souza, N.L.A., Williamson, H.O., Moody, L.O., Diczfalussy, E.,
Further assesment of the reliability of progesterone
assays by competitive protein binding
In: Steroid assay by protein binding
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproduc-
tive Endocrinology, 2 nd Symposium
Acta endocr. (Kbh) Suppl. 147, 171 (1970)
- De Villa, G.O., Roberts, K., Wiest, W.G., Mikhail, G.,
Flickinger, G.,
A specific radioimmunoassay of plasma progesterone
J.clin.Endocr.Metab. 35, 458 (1972)
- Diamond, M., Rust, N., Westphal, U.,
High-affinity binding of progesterone, testosterone
and cortisol in normal and androgen-treated guinea
pigs during various reproductive stages: Relationship
to masculinization
Endocrinology 84, 1143 (1969)
- Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S.M., Liebermann, S.,
Steroid-protein conjugates. I. Preparation and charac-
terisation of bovine serum albumin with testosterone
and corticosterone
J.Biol.Chem. 228, 713 (1957)
- Furuyama, S., Nugent, C.A.,
A radioimmunoassay for plasma progesterone
Steroids 17, 663 (1971)
- Goodfriend, L., Schon, A.H.,
Preparation of the estrone-protein conjugate
Can.J.Biochem.Biophys. 36, 1177 (1958)

Hagerman, D.D., Williams, K.L.,

Comparison of a protein binding displacement method with a double isotope derivative method for determination of plasma progesterone

Am.J.Obstet.Gynec. 104, 114 (1969)

Henning, H.D., Zander, J.,

Verwendung von Hübeners 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase bei mikrochemischer Identifizierung und Trennung von Steroiden

Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 330, 31 (1962)

Hoffmann, B.,

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Kind. Entwicklung von Meßverfahren und physiologische Daten

München-Weihenstephan, Habilitationsschrift v.1972.

Hughes, H.K.,

Suggested nomenclature in applied spectroscopy

Anal.Chem. 24, 1349 (1952)

Jewelewicz, R., Cantor, B., Dyrenfurth, I., Warren, M.P.,

Vande Wiele, R.L.,

Intravenous infusion of prostaglandin F_{2 α} in the mid-luteal phase of the normal human menstrual cycle

Prostaglandins 1, 443 (1972)

Johansson, E.D.B.,

Progesterone levels in peripheral plasma during the luteal phase of the normal human menstrual cycle measured by a rapid competitive protein binding technique

Acta endocr. (Kbh) 61, 392 (1969)

Johansson, E.D.B., Wide, L.,

Periovulatory levels of plasma progesterone and
luteinizing hormone in women

Acta endocr. (Kbh) 62, 82 (1969)

Jones, G.S., Wentz, A.C.,

The effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ infusion on
corpus luteum function

Am.J.Obstet.Gynec. 114, 393 (1972)

Kirton, K.T., Pharris, B.B., Forbes, A.D.,

Luteolytic effects of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in primates

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 133, 314 (1970)

Lehmann, F., Peters, F., Breckwoldt, M., Bettendorf, G.,

Plasma progesterone levels during infusion of
prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the human

Prostaglandins 1, 269 (1972)

Le Maire, W.J., Shapiro, A.G.,

Prostaglandin $F_{2\alpha}$: Its effect on the corpus luteum
of the menstrual cycle

Prostaglandins 1, 259 (1972)

Lindner, H.R., Perel, E., Friedlander, A., Zeitlin, A.,

Specificity of antibodies to ovarian hormones in
relation to the site of attachment of the steroid
happen to the peptide carrier

Steroids 19, 357 (1972)

Lipsett, M.B., Doerr, P., Bermudez, J.A.,

Saturation assays for plasma progesterone and 17-
hydroxyprogesterone

In: Steroid assay by protein binding

Karolinska Symposia on Research Methods in Reproduc-
tive Endocrinology, 2 nd Symposium

Acta endocr. (Kbh) Suppl. 147, 155 (1970)

- Luisi, M., Gambassi, G., Marescotti, V., Savi, C., Polvani, F.,
A gas-chromatographic method for the quantitative
determination of progesterone in human plasma
J.Chrom. 18, 287 (1965)
- Luisi, M., Levanti, S., Franchi, F.,
The description and evaluation of a competitive
protein binding radioassay of plasma progesterone
in pregnancy
Fertil.Steril. 22, 435 (1971)
- Lurie, A.O., Villee, C.A., Reid, D.E.,
Progesterone in the blood. A quantitative method
employing gas-liquid chromatography
J.clin.Endocr. 26, 7 (1966)
- Lurie, A.O., Patterson, R.J.,
Progesterone in nonpregnancy plasma
An assay method for the clinical chemistry laboratory
Clin.Chem. 16, 856 (1970)
- Martin, B.T., Cooke, B.A., Black, W.P.,
Evaluation of a rapid method for the measurement
of plasma progesterone by competitive protein
binding
J.Endocr. 46, 369 (1970)
- Mc Cracken, J.A., Glew, M.E., Scaramuzzi, R.J.,
Corpus luteum regression induced by prostaglandin F_{2α}
J.clin.Endocr. 30, 544 (1970)
- Midgley, A.R., Niswender, G.D., Ram, J.S.,
Haptenradioimmunoassay: A general procedure for
estimation of standard and other haptenic substances
Steroids 13, 731 (1969)

- Mikhail, G., Wu, C.H., Ferin, M., Vande Wiele, R.L.,
Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol
Steroids 15, 333 (1970)
- Milgrom, E., Atger, M., Baulieu, E.E.,
Progesterone binding plasma protein (PBP)
Nature 228, 1205 (1970)
- Murphy, B.E.P., Engelberg, W., Pattee, C.J.,
Simple method for the determination of plasma
corticoids
J.clin.Endocr. 23, 293 (1963)
- Murphy, B.E.P.,
Application of the property of protein-binding to
the assay of minute quantities of hormones and other
substances
Nature 201, 679 (1964)
- Murphy, B.E.P.,
Some studies of the protein-binding of steroids
and their application to the routine micro and ul-
tramicro measurement of various steroids in body
fluids by competitive protein-binding radioassay
J.clin.Endocr. 27, 973 (1967)
- Murphy, B.E.P.,
Methodological problems in competitive protein-bin-
ding techniques; the use of Sephadex column chromato-
graphy to separate steroids
In: Steroid assay by protein binding
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproduc-
tive Endocrinology, 2 nd Symposium
Acta endocr. (Kbh) Suppl. 147, 37 (1970)

- Neill, J.D., Johansson, E.D.B., Datta, J.K., Knobil, E.,
Relationship between the plasma levels of luteinizing
hormone and progesterone during the normal menstrual
cycle
J.clin.Endocr. 27, 1167 (1967)
- Niswender, G.D., Midgley, A.R.,
Hapten-radioimmunoassay for steroid hormones
In: Immunological methods in steroid determination
Péron, F., Caldwell, B., Eds.
Appleton-Century-Crofts-Meredith, N.Y. 149 (1970)
- Pharriss, B.B., Wyngarden, L.J.,
The effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on the progesterone
content of ovaries from pseudopregnant rats
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 130, 92 (1969)
- Pichon, M.F., Milgrom, E.,
Competitive protein binding assay of progesterone
without chromatography
Steroids 21, 335 (1973)
- Pizarro, M.A.,
A modified procedure for the measurement of plasma
progesterone by reliance on protein binding
J.Ster.Biochem. 2, 321 (1971)
- Reeves, B.D., De Souza, M.L.A., Thompson, I.E., Diczfalusy, E.,
An improved method for the assay of progesterone
by competitive protein binding
Acta endocr. (Kbh) 63, 225 (1970)
- Reeves, B.D., Diczfalusy, E.,
Plasma progesterone and competitive protein binding
assay
Am.J.Obstet.Gynec. 109, 775 (1971)

- Richterich, R., Colombo, J.P.,
Ultramikromethoden im klinischen Laboratorium
II. Die Bestimmung der Zuverlässigkeit von Labora-
toriumsmethoden
Klin.Wschr. 40, 529 (1962)
- Richterich, R.,
Klinische Chemie
3., erweiterte Auflage
S. Karger, Basel 1971
- Riondel, A., Tait, J.F., Tait, S.A.S., Gut, M., Little, B.,
Estimation of progesterone in human peripheral
blood using ^{35}S -thiosemicarbazide
J.clin.Endocr. 25, 229 (1965)
- Rubin, B.L., Maralit, M., Kinard, J.H.,
A reproducible, reliable method for determination
of progesterone and 20α -dihydroprogesterone in
small volumes of plasma or serum, suitable for
a range of concentrations from follicular phase
to late pregnancy values. Levels found throughout
a normal human pregnancy
J.clin.Endocr. 31, 511 (1970)
- Seal, U.S., Doe, R.P.,
In: Steroid Dynamics
Pincus, G., Nakao, T., Tait, J.F., Eds.
Academic Press, New York, 63 (1966)
- Snedecor, G.W.,
Queries
Biometrics 8, 85 (1952)

- Speroff, L., Caldwell, B.U., Brock, W.A., Anderson, G.G.,
Hobbins, J.C.,
Hormone levels during prostaglandin F_{2α} infusions
for therapeutic abortion
J.clin.Endocr. 34, 531 (1972)
- Spieler, J.M., Webb, R.L., Saldarini, R.J., Coppola, J.A.,
A radioimmunoassay for progesterone
Steroids 19, 751 (1972)
- Stone, S., Nakamura, R.M., Mishell, D.R., Thorneycroft, I.H.,
A modified technique for the assay of progesterone
in blood using celite column chromatography
Steroids 17, 411 (1971)
- Strott, C.A., Lipsett, M.B.,
Measurement of 17-hydroxyprogesterone in human
plasma
J.clin.Endocr. 28, 1426 (1968)
- Swain, M.C.,
The assay of plasma progesterone in women by a
simple competitive protein binding method using
guinea-pig serum
Clin.Chim.Acta 39, 455 (1972)
- Van der Molen, H.J., Groen, D.,
Determination of progesterone in human peripheral
blood using gas-liquid chromatography with electron
capture detection
J.clin.Endocr. 25, 1625 (1965)
- Van der Molen, H.J., Aakvaag, A.,
Progesterone
In: Hormones in blood, Vol. 2
Gray, C.H., Bacharach, A.L., Eds.
Academic Press, London, New York, 67 (1967)

- Whitby, L.G., Mitchell, F.L., Moss, D.W.,
Quality control in routine clinical chemistry
Adv.clin.Chem. 10, 65 (1967)
- Wiqvist, N., Bygdeman, M., Kirton, K.T.,
Nobel Symposium no. 15
Control of Human Fertility
Diczfalusy, E., Borell, N., Almqvist and Wiksell, Eds.
Stockholm, 137 (1971)
- Woolever, C.A., Goldfien, A.,
A double-isotope derivative method for plasma progesterone assay
Int.J.Appl.Radiation and Isotopes 14, 163 (1963)
- Yannone, M.E., Mc Comas, D.B., Goldfien, A.,
The assay of plasma progesterone
J.Gas Chromat. 2, 30 (1964)
- Yoshimi, T., Lipsett, M.B.,
The measurement of plasma progesterone
Steroids 11, 527 (1968)
- Youssefnejadian, E., Florensa, E., Collins, W.P., Sommerville, I.F.,
Radioimmunoassay of plasma progesterone
J.steroid Biochem. 3, 893 (1972)
- Yussman, M.A., Taymor, M.L.,
Serum levels of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone and of plasma progesterone related to ovulation by corpus luteum biopsy
J.clin.Endocr. 30, 396 (1970)

Tabelle 1

Gruppe I : Patientinnen mit intrauterinem Fruchttod

Fall Nr.	SSW.	PGF _{2α}		Infusions-		PCB*	Wehen	Ausstoßung
		mg	µg/min	dauer	Std.			
1	43.	7,5	11,4	11:00		+	+	10 Std. nach Inf.ende
2	40.	3,8	11,5	5:30		+	+	bei Inf.ende

*Paracervikalblock

Tabelle 2

Gruppe II : Patientinnen mit Missed abortion

Fall Nr.	SSW.	PGF _{2α}		Infusions- dauer Std.	PCB	Wehen	Ausstoßung
		mg	µg/min				
3	33.	50	72,5	11:30	+	+	bei Inf.ende
4	32.	45	58,8	12:45	-	+	--
5	31.	100	185,2	9:00	+	+	bei Inf.ende
6	27.	42,5	61,6	11:30	+	+	7,5 Std.nach Inf.ende
7	26.	37,5	59,0	10:35	+	+	bei Inf.ende
8	23.	60	113,3	8:45	+	+	bei Inf.ende
9	21.	18,8	48,1	6:30	-	+	--
10	20.	43	73,3	10:00	+	+	bei Inf.ende
11	19.	13	58,0	3:45	-	+	bei Inf.ende
12	16.	21	46,6	7:30	+	+	bei Inf.ende
13	16.	19,5	43,8	7:25	+	+	bei Inf.ende
14	14.	64,8	81,0	12:40	-	-	12 Std.nach Inf.ende

Tabelle 3

Gruppe III : Patientinnen mit intakter Schwangerschaft und
Blasenmole*.

Fall Nr.	SSW.	PGF _{2α}		Infusions- dauer Std.	PCB	Wehen	Ausstoßung
		mg	µg/min				
15*	18.	50	101,0	8:15	+	+	bei Inf.ende
16	18.	25	192,3	2:10	+	+	bei Inf.ende
17	17.	50	104,0	7:30	+	+	(--)
		32,5	103,1	7:30	+	+	bei Inf.ende
18	17.	50	104,2	8:00	+	+	(--)
		25	83,3	5:00	+	+	bei Inf.ende

Tabelle 4

Autor	Methode	Reagenzienleerwert ng
JOHANSSON (1969)	CPB* ohne Chromatographie	0.0 - 0.10
YOSHIMI & LIPSETT (1968)	CPB mit Dünnschicht- und Säulenchromatographie.	0.05
REEVES et al. (1970)	CPB mit Dünnschichtchromatographie	0.06 $\pm$ 0.06
MARTIN et al. (1970)	CPB mit Papierchromatographie	0.055 $\pm$ 0.001
STONE et al. (1971)	CPB mit Celite-Säulenchromatographie	0 - 0.25
ABRAHAM et al. (1971)	RIA ⁺ mit Celite-Säulenchromatographie	0.030
BODLEY et al. (1973)	RIA ⁺⁺ ohne Chromatographie	0 - 0.050
Diese Arbeit	CPB mit Sephadex LH-20-Säulenchromatographie	0.07 $\pm$ 0.05

* competitive protein binding = Proteinbindungsmethode

⁺ Radioimmunoassay = radioimmunologische Bestimmung mit 11-Des-oxy cortisol-21-Hemisuccinat-Humanserum-Albumin als Antigen

⁺⁺ mit 11 α -OH-Progesteron-Hemisuccinat-Rinderserum-Albumin als Antigen

Tabelle 5

RICHTIGKEIT DER METHODE

Zusatzversuche mit Progesteron

Zugesetztes Progesteron ng	Wiedergefundenes Progesteron ng	Standardab- weichung ng	Variationsko- effizient %	n
0.25	0.28	± 0.07	25.0	8
0.50	0.57	± 0.07	12.2	10
1.00	1.00	± 0.05	5.4	8
1.50	1.43	± 0.15	10.5	5
2.00	2.10	± 0.14	6.6	10
2.50	2.42	± 0.13	5.3	6

Tabelle 6 Progesteronkonzentrationen im Plasma (ng/ml)

Methode	Autoren	Follikelphase	Lutealphase	Postmenopause	Männer
Doppel-Iso- topen-Deriva- vat	Riondel et al. (1965)	1.13±0.49	10.4±3.2		0.28±0.13
Gaschromato- graphie	V.d.Molen & Groen (1965)	0.49 (0.15-1.1)	15.2 (7.9-20.6)		0.28 (0.15-0.48)
Kompetitive Proteinbin- dung	Neill et al. (1967)	0.4 (0.2-1.8)			0.2
	Yoshimi & Lipsett (1968)	0.43±0.37 (0.05-1.5)		0.34±0.20 (ovarektom.)	0.33±0.17
	Johansson (1969)	0.32±0.25			
	Reeves et al. (1970)	0.51±0.17			0.33±0.14
	Martin et al. (1970)	1.9±1.1	8.2±7.4		0.25±0.16
	Rubin et al. (1970)			0.09±0.04	0.12±0.04
	Pizarro (1971)	0.7			0.24±0.18
	Stone et al. (1971)	0.7 (0.1-1.5)	10.9 (3.6-24.0)		
	Swain (1972)	1.18 (0.76-1.77)	8.45 (3.42-17.13)		0.80 (0.22-1.32)
	Pichon & Milgrom (1973)	0.81±0.58	12.50±2.96	0.30±0.22	0.46±0.14
	Diese Arbeit	0.23 (0.15-0.35)	12.6±1.40 (Pool)	0.16±0.035 (Pool)	0.30±0.04
Radioimmuno- logische Be- stimmung	Abraham et al. (1971)	0.54±0.10	8.56±4.66	0.18±0.063	0.27±0.064
	Furuyama & Nugent	0.26±0.19	8.28±6.34		0.22±0.09
	Youssefinejadian et al. (1972)	0.42±0.18	7.7±1.90		0.23±0.06

Tabelle 7

Konzentrationen von Progesteron im peripheren Plasma
während eines normalen Menstruationszyklus. Fall 1.
(Doppelbestimmungen)

Zyklustag	Progesteron ng/ml Plasma		
	1.Wert	2.Wert	Mittelwert
2.	0,24	0,24	0,24
4.	0,22	0,30	0,26
6.	0,30	0,36	0,33
8.	0,18	0,24	0,21
10.	0,32	0,36	0,34
11.	0,30	0,42	0,36
12.	0,21	0,24	0,22
13.	0,24	0,30	0,27
14.	0,60	0,72	0,66
15.	1,02	1,26	1,14
16.	2,34	2,52	2,43
17.	4,08	4,68	4,38
18.	8,75	6,90	7,82
19.	9,48	7,50	8,49
20.	8,75	7,20	7,97
21.	13,20	13,80	13,50
22.	13,68	15,12	14,40
23.	14,69	15,42	15,05
24.	9,60	11,40	10,50
25.	7,80	7,80	7,80
26.	3,06	3,76	3,41
27.	0,72	0,90	0,81

Tabelle 8

Konzentrationen von Progesteron im peripheren Plasma
während eines normalen Menstruationszyklus. Fall 2.
(Doppelbestimmungen)

Zyklustag	Progesteron ng/ml Plasma		
	1.Wert	2.Wert	Mittelwert
2.	0,33	0,33	0,33
4.	0,18	0,24	0,21
5.	0,21	0,24	0,22
7.	0,30	0,18	0,24
9.	0,30	0,21	0,25
10.	0,24	0,39	0,31
11.	0,30	0,24	0,27
12.	0,22	0,24	0,23
13.	0,22	0,30	0,26
14.	0,60	0,66	0,63
15.	1,40	2,10	1,55
16.	5,08	5,52	5,30
17.	8,09	7,63	7,86
18.	12,30	12,72	12,51
19.	9,00	10,92	9,96
20.	12,24	11,70	11,97
21.	14,40	15,60	15,00
22.	12,00	12,24	12,12
23.	16,20	16,80	16,50
24.	10,62	10,50	10,56
25.	12,30	10,80	11,55
26.	1,80	2,10	1,95
27.	2,70	2,70	2,70
28.	1,92	2,40	2,16
29.	0,41	0,30	0,35

Tabelle 9

Progesteronkonzentrationen im peripheren Plasma während der
Prostaglandin-Infusionen

Fall Nr.	Infusionsdauer (Std)	ng Progesteron/ml Plasma			% des Ausgangs- wertes
		1.Wert	2.Wert	Mittelwert	
1	0:00	122,4	109,0	115,7	100,0
	2:00	111,0	107,0	109,0	94,2
	4:00	98,0	90,6	94,3	81,5
	6:00	98,0	91,2	94,6	81,7
	8:00	81,0	89,2	85,1	73,5
	10:00	70,0	72,5	71,2	61,5
2	0:00	153,0	159,0	156,0	100,0
	2:15	148,0	146,0	147,0	94,2
	4:25	126,0	138,0	132,0	84,6
	5:15	114,0	124,0	119,0	76,2
3	0:00	102,0	98,7	100,3	100,0
	2:15	91,4	84,0	87,7	87,4
	4:45	78,6	78,6	78,6	78,4
	7:30	78,6	81,2	79,9	79,6
	9:30	80,0	77,1	78,5	78,3
	11:30	80,7	78,0	79,3	79,1
4	0:00	82,0	80,0	81,0	100,0
	3:30	68,8	72,1	70,4	86,9
	4:20	54,8	57,9	56,3	69,5
	5:30	56,8	55,4	56,1	69,2
	6:40	54,8	58,2	56,5	69,7
	8:30	59,2	54,9	57,0	70,1
	10:00	56,0	53,7	54,8	67,7
	12:30	61,2	57,1	59,1	73,0

Fortsetzung Tabelle 9

Fall Nr,	Infusionsdauer (Std)	ng Progesteron/ml Plasma			% des Ausgangs- wertes
		1.Wert	2.Wert	Mittelwert	
5	0:00	69,0	80,0	74,5	100,0
	1:45	53,0	45,0	49,0	65,7
	3:45	60,0	61,0	60,5	81,2
	5:45	54,5	51,6	53,0	71,1
	7:50	56,4	61,6	59,0	79,0
	8:30	36,0	34,4	35,2	47,1
6	0:00	4,90	5,72	5,31	100,0
	2:00	5,45	5,15	5,25	100,0
	4:00	4,05	4,15	4,10	77,2
	6:30	4,05	4,00	4,02	75,8
	8:00	2,56	2,18	2,37	50,5
7	0:00	17,8	15,7	16,7	100,0
	3:15	15,2	13,2	14,2	86,4
	6:00	12,0	11,6	11,8	70,2
	8:00	11,8	11,2	11,5	69,3
	11:00	8,7	8,4	8,5	51,5
8	0:00	20,0	17,8	18,9	100,0
	2:00	14,0	14,5	14,2	75,0
	4:00	12,5	12,0	12,2	64,8
	8:00	11,5	11,5	11,5	60,8
9	0:00	3,35	3,60	3,47	100,0
	2:00	3,50	3,22	3,36	96,8
	4:00	2,35	2,75	2,55	76,4
	6:30	2,67	2,48	2,57	74,2

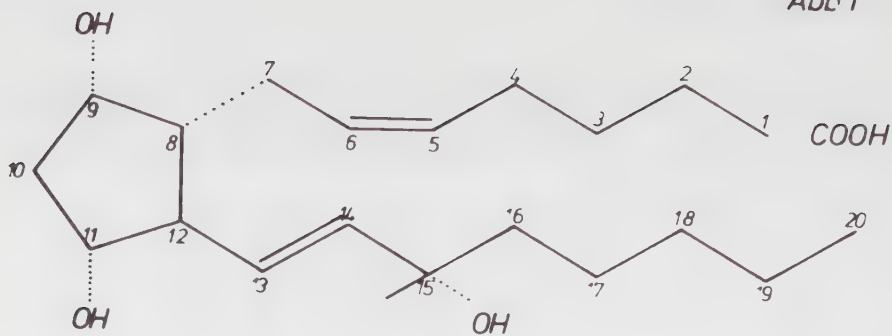
Fortsetzung Tabelle 9

Fall Nr.	Infusionsdauer (Std)	ng Progesteron/ml Plasma			% des Ausgangs- wertes
		1.Wert	2.Wert	Mittelwert	
10	0:00	27,5	26,5	27,0	100,0
	2:00	23,5	24,0	23,7	88,0
	4:00	20,0	18,2	19,1	70,9
	6:00	15,2	15,2	15,2	56,5
11	0:00	2,80	3,30	3,05	100,0
	2:00	2,60	2,40	2,50	82,0
	5:15	1,45	1,22	1,33	43,8
12	0:00	28,5	29,5	29,0	100,0
	2:30	24,5	31,0	27,7	95,7
	4:45	21,0	21,2	21,1	72,9
	6:45	23,7	26,0	24,8	85,9
	8:40	15,2	15,0	15,1	52,2
13	0:00	18,0	20,2	19,1	100,0
	2:15	16,0	17,0	16,5	86,3
	4:15	18,5	17,7	18,1	94,8
	6:15	19,2	19,2	19,2	100,0
	7:45	12,5	12,9	12,7	66,4
14	0:00	39,5	37,5	38,5	100,0
	2:00	38,0	34,0	36,0	93,5
	4:00	35,5	34,0	34,7	90,3
	6:15	33,5	36,0	34,7	86,4
	8:20	43,2	41,5	42,3	110,0
	10:20	37,0	40,5	38,7	100,6
	12:20	39,0	41,5	40,2	104,4

Fortsetzung Tabelle 9

Fall Nr.	Infusionsdauer (Std)	ng Progesteron/ml Plasma			% des Ausgangs- wertes
		1.Wert	2.Wert	Mittelwert	
15	0:00	10,10	10,30	10,20	100,0
	4:00	7,18	7,05	7,11	69,4
	6:00	7,05	7,40	7,22	70,4
	8:10	6,45	6,60	6,52	63,6
16	0:00	42,5	42,2	42,3	100,0
	1:00	33,5	38,0	35,7	84,0
	2:00	24,2	20,0	22,1	52,0
17	0:00	54,0	59,6	56,8	100,0
	2:00	54,2	60,0	57,1	100,5
	4:00	48,4	39,6	44,0	77,5
	6:15	34,0	37,6	35,8	62,5
	8:00	34,0	33,8	33,9	59,6
	0:00	45,2	41,7	43,4	76,5
	3:30	29,2	32,0	30,6	53,9
	5:00	31,8	30,0	30,9	54,4
18	0:00	37,0	38,5	37,7	100,0
	2:00	23,0	25,0	24,0	63,6
	4:00	28,0	30,5	29,2	77,5
	6:00	26,5	22,2	24,3	64,5
	8:00	21,0	25,0	30,0	61,0
	0:00	38,0	38,0	38,0	100,1
	2:00	29,5	31,5	30,5	79,4
	4:00	32,5	34,5	33,5	88,8

Abb 1



Strukturformel des Prostaglandins $F_{2\alpha}$

Abbildung 2

Schematische Darstellung der kompetitiven Proteinbindungsreaktion (REEVES & DICZFALUSY, 1971)



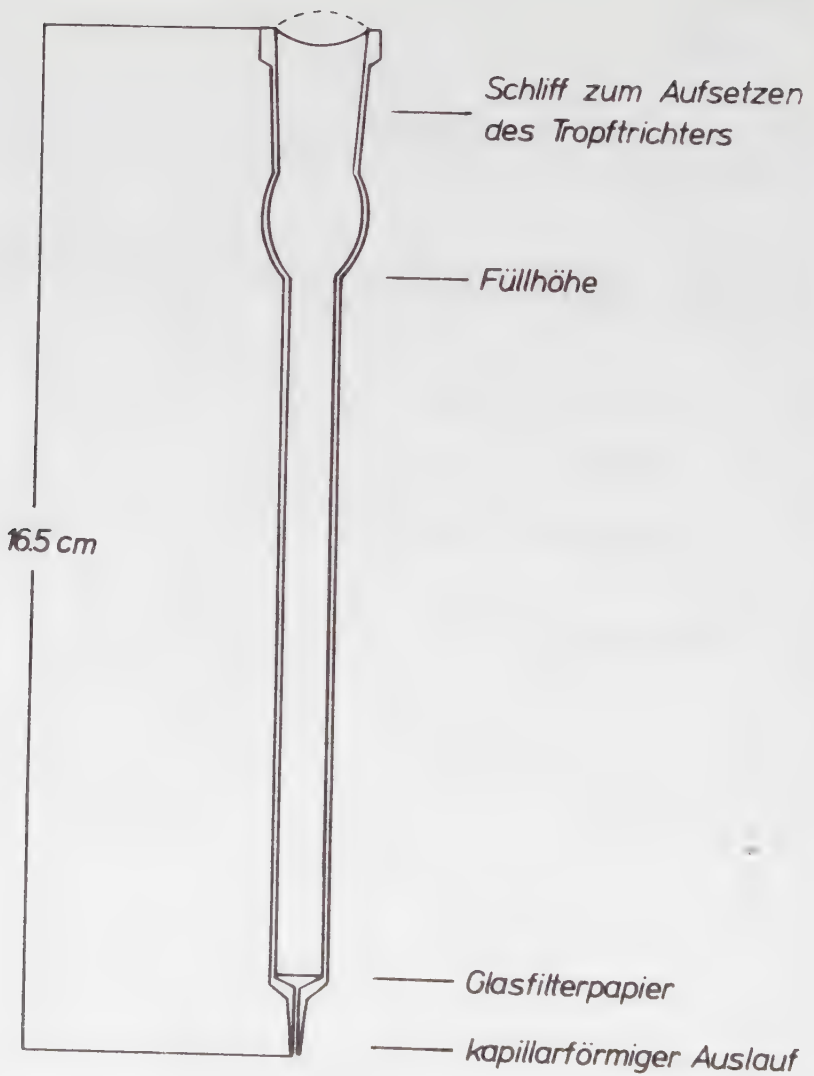
II. ADSORPTION DES FREIEN P UND ${}^3\text{H-B}$

III. BESTIMMUNG VON $\text{CBG} - {}^3\text{H-B}$

B = Corticosteron

P = Progesteron

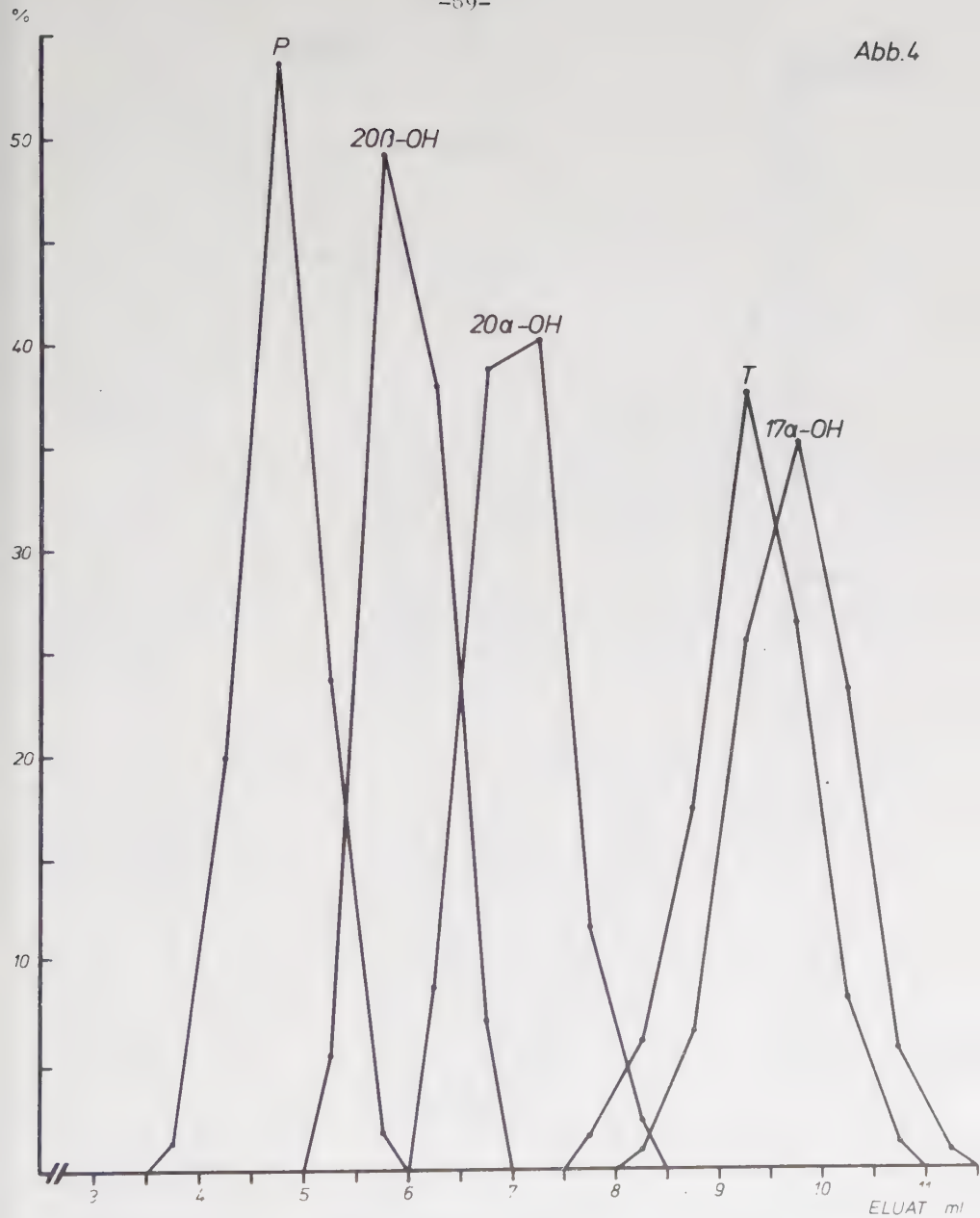
Abb.3



Sephadex LH-20 Chromatographiesäule

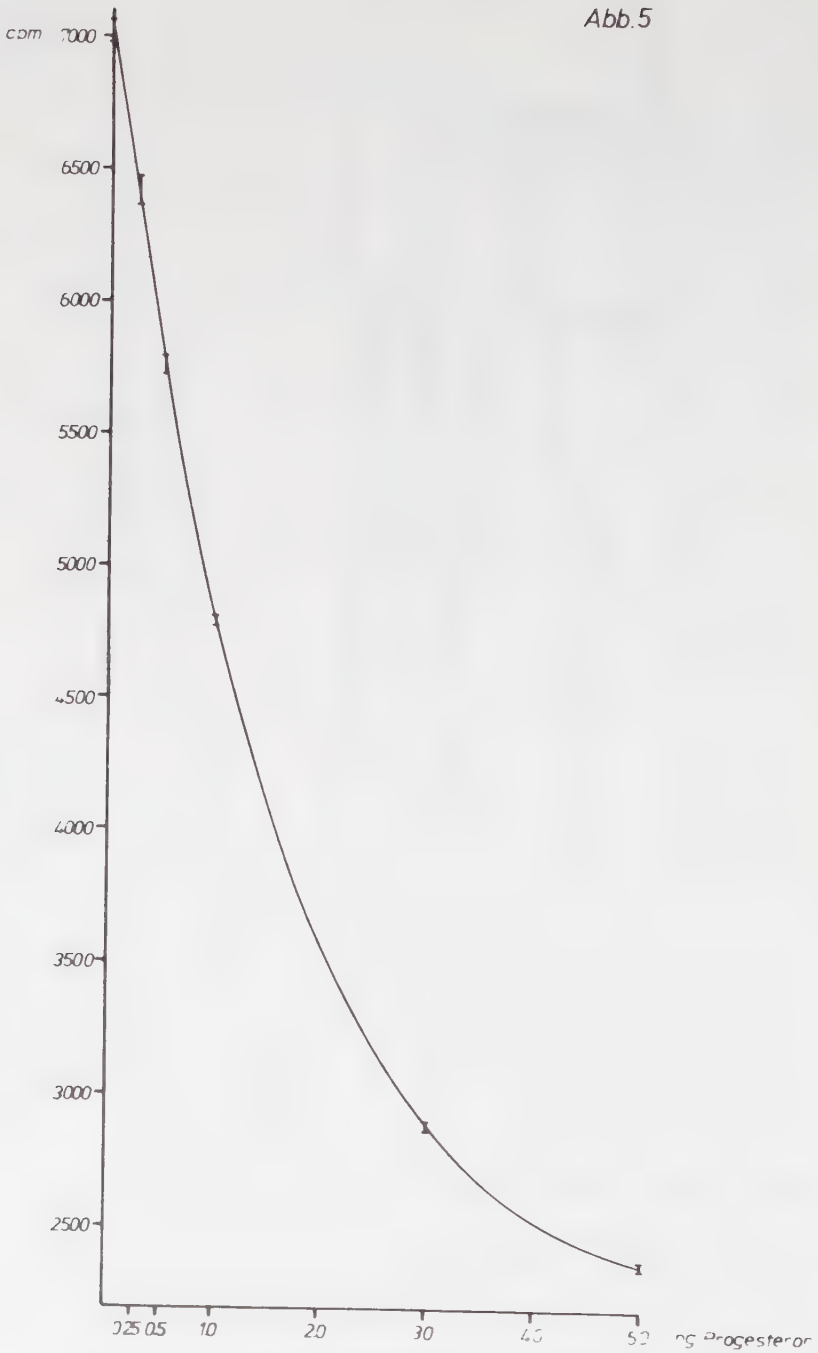
innerer Durchmesser : 0.65 cm

Säulenvolumen : 3.25 ml



Trennung von Progesteron (P), 20β-Dihydroprogesteron (20β-OH), 20α-Dihydroprogesteron (20α-OH), Testosteron (T) und 17α-Hydroxyprogesteron (17α-OH) mit der Sephadex LH-20 Chromatographiesäule

Abb.5



Progesteron - Standardkurve

Abbildung 6

Bestimmung von Progesteron mit CBG

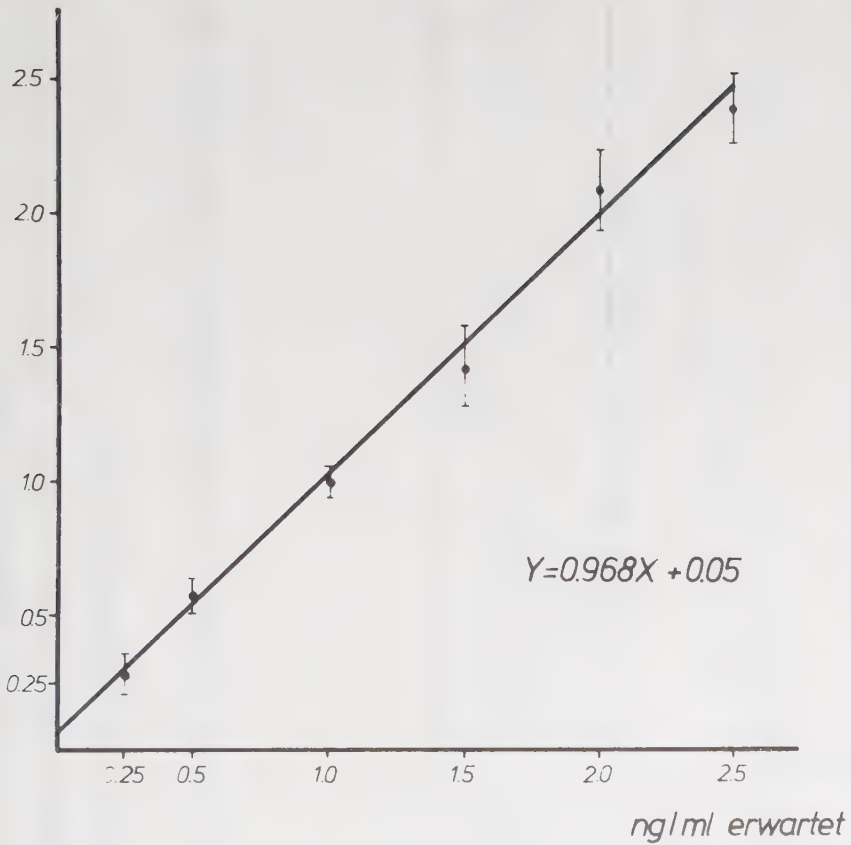
Extraktion:	0,1 - 1 ml Plasma ad 1 ml mit Aqua pro injectione 2x mit 5 ml Diäthyläther 1 min schütteln Äther jeweils abpipettieren, eindampfen
Säulenchromatographie:	Ätherrückstand in 100 ul n-Hexan:Essigester:Methanol 85:5:10 lösen auftragen Progesteronfraktion sammeln, eindampfen
Kompetitive Proteinbindung:	Progesteronfraktion + 1 ml CBG-Lösung 10 min Wasserbad 40°C 15 min Eisbad + 80 mg Florisil 30 sek schütteln 0,5 ml Überstand + 10 ml Szintillationsflüssigkeit
Quantitative Auswertung:	Messung der Radioaktivität Progesteronmenge nach Standardkurve ermitteln



Bestimmung der Bindungskapazität des verwendeten Plasmas

Progesteron
ng/ml beobachtet

Abb. 8



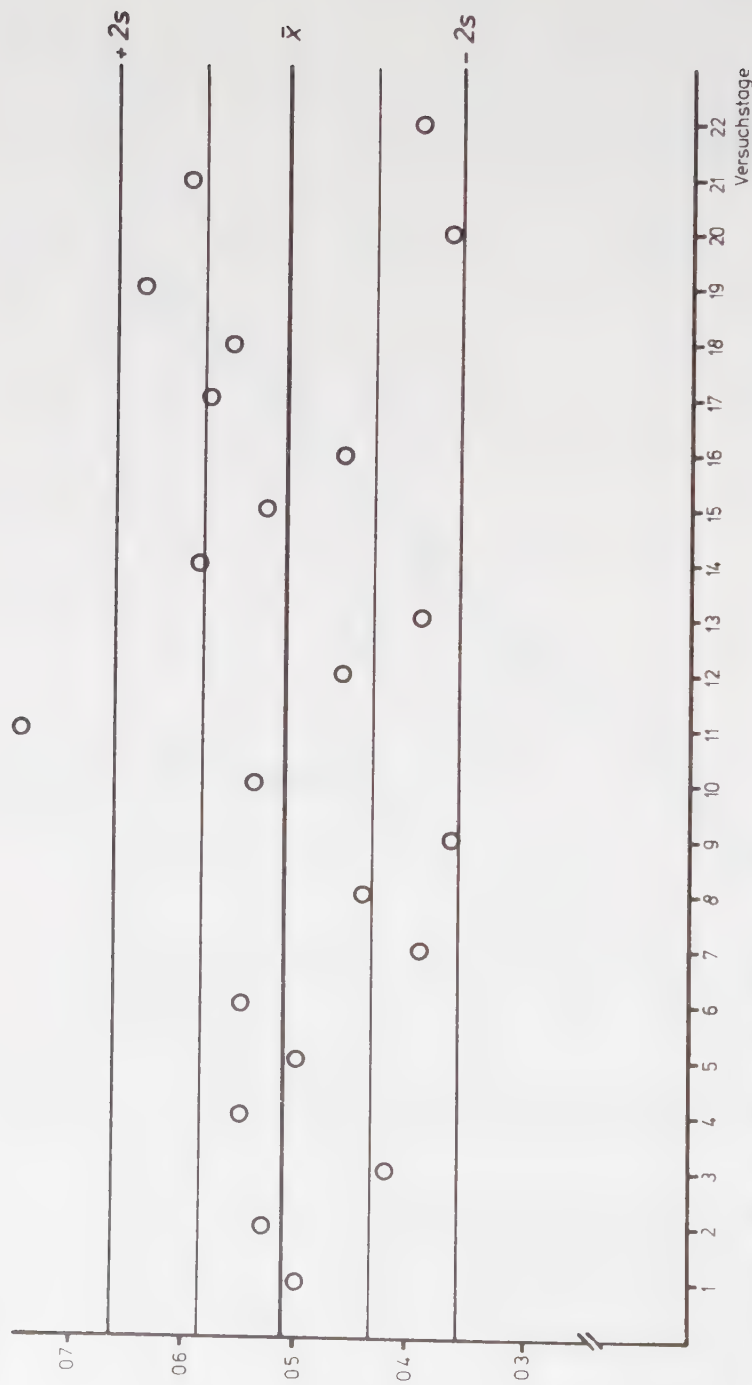
⊥ Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

Darstellung der Richtigkeitsprüfung der Methode

Berechnung der Regressionsgeraden und des Korrelations-
koeffizienten

Progesteron
ng/ml

Abb. 9

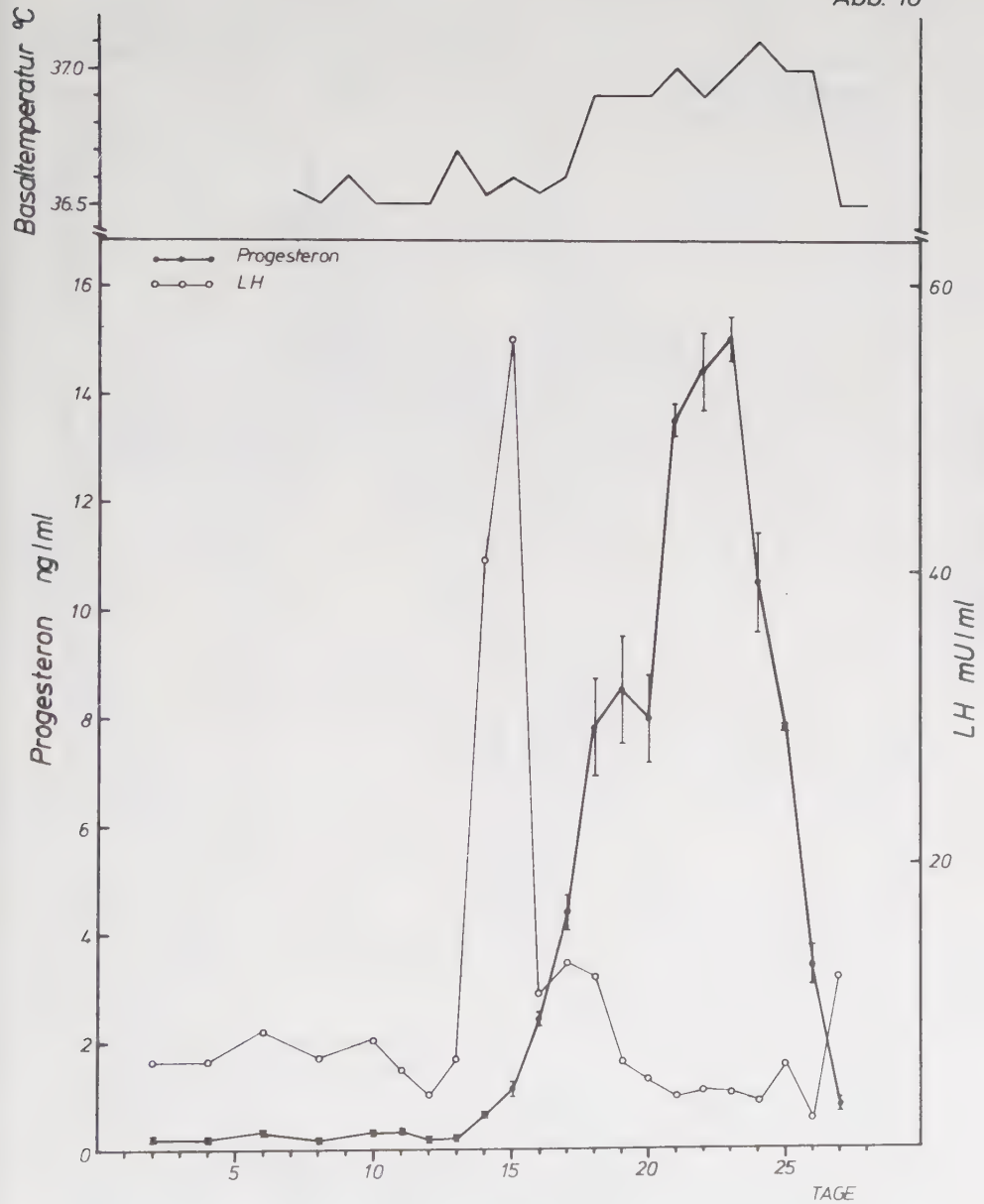


Kontrollkarte der Methode während eines Versuchsabschnittes

$\bar{x}$ = Mittelwert des Kontrollserums

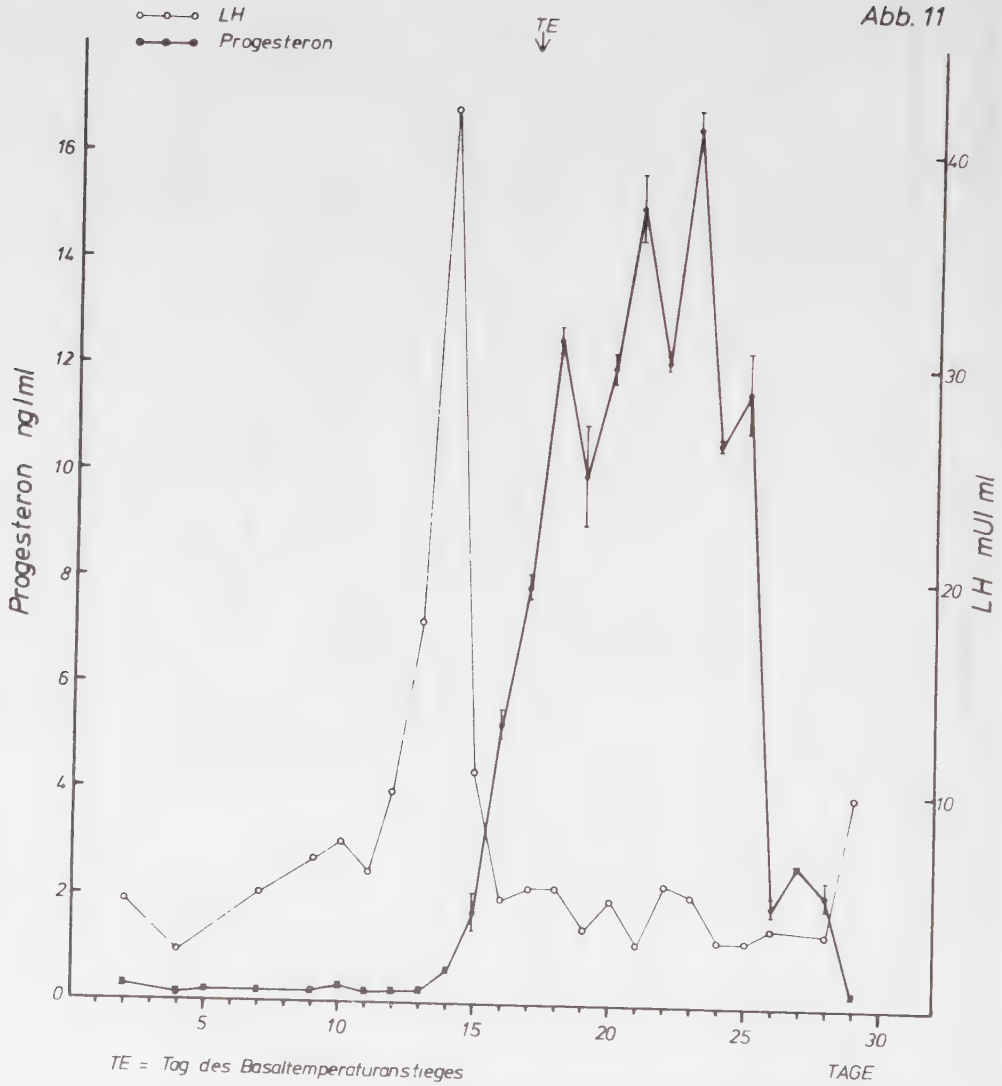
$2s$ = doppelte Standardabweichung des Mittelwertes

Abb. 10



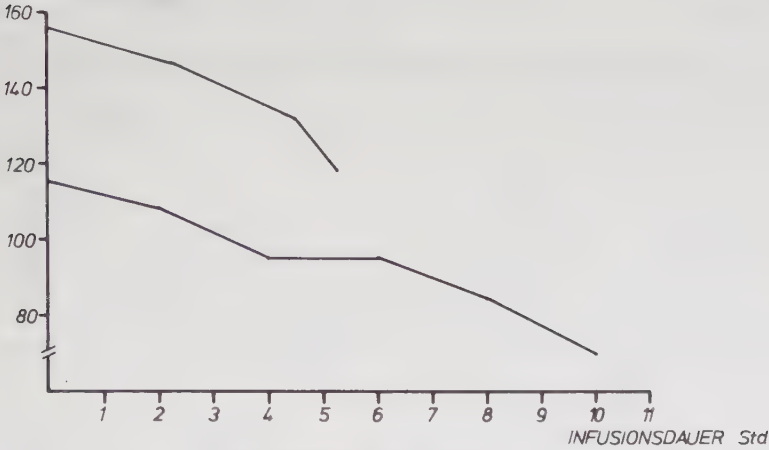
Konzentrationen von Progesteron und LH im Plasma während eines normalen Menstruationszyklus (Patientin 1)

Abb. 11



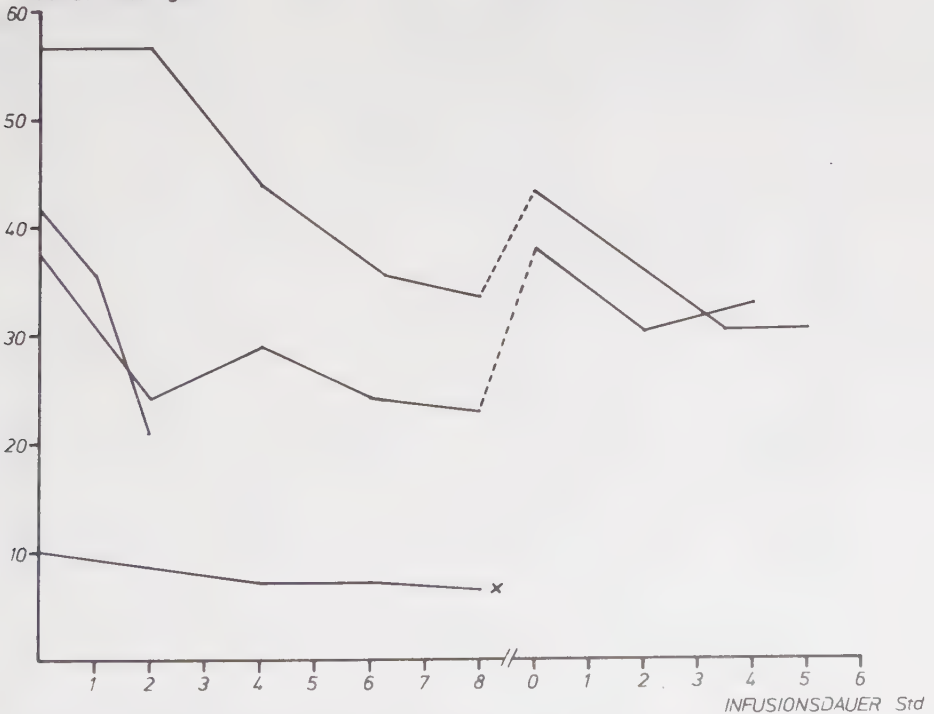
Konzentrationen von Progesteron und LH im Plasma während eines normalen Menstruationszyklus (Patientin 2)

PROGESTERON ng/ml



Gruppe I Intrauteriner Fruchttod

PROGESTERON ng/ml

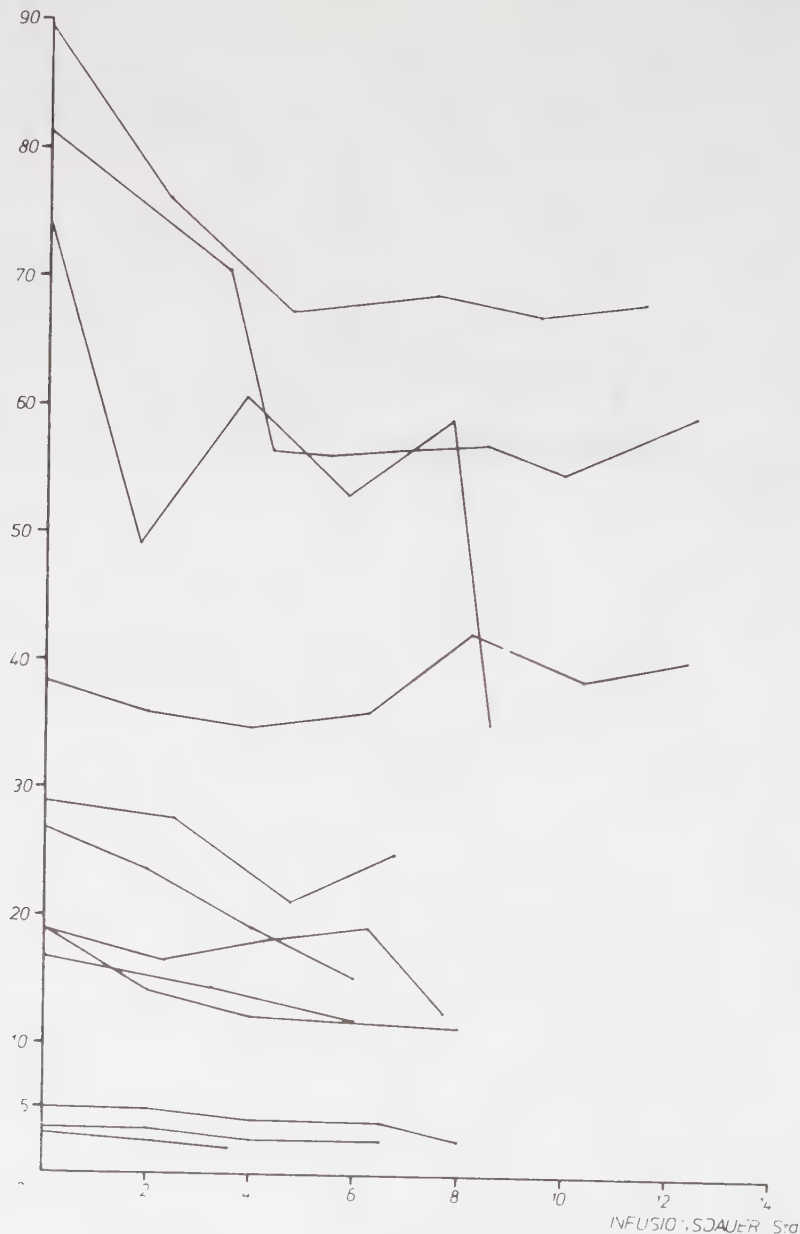


Gruppe III Intakte Schwangerschaft und Blasenmole(x)

Progesteronkonzentrationen im peripheren Plasma (ng/ml) während der Prostaglandin-Infusion

PROGESTERON ng/ml

Abb. 13

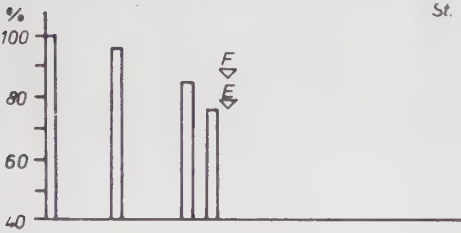
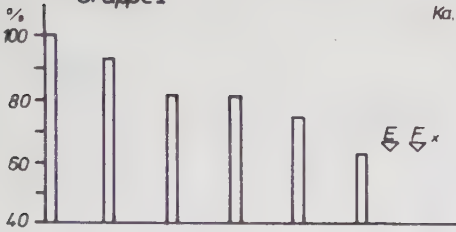


Gruppe II Missed abortion

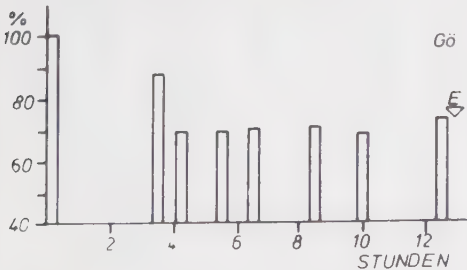
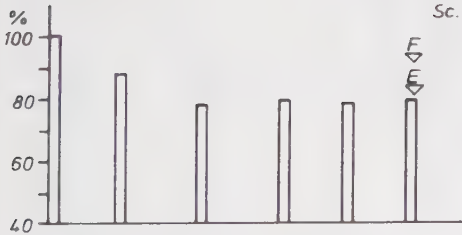
Progesteronkonzentrationen im peripheren Plasma (ng/ml) während der Prostaglandin-Infusion

PROZENTUALER PROGESTERONABFALL WÄHREND DER PGF_{2α}-INFUSION

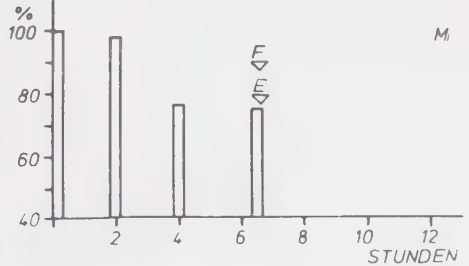
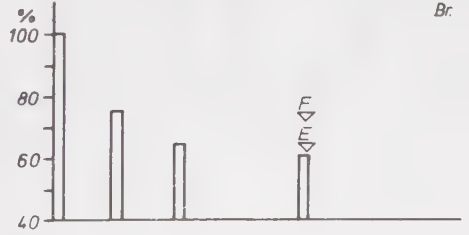
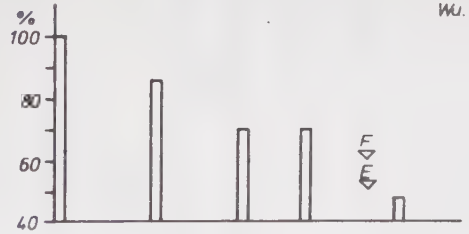
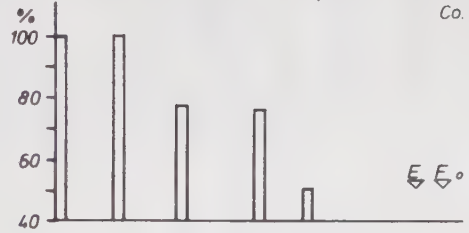
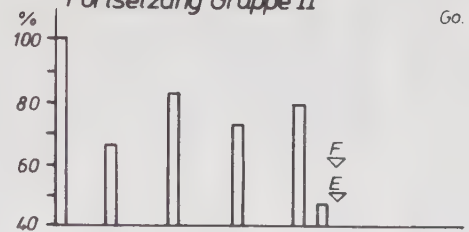
Gruppe I



Gruppe II

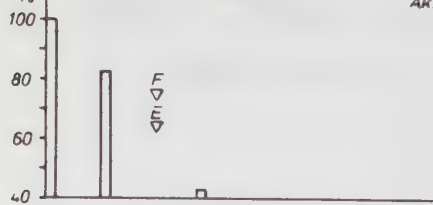


Fortsetzung Gruppe II

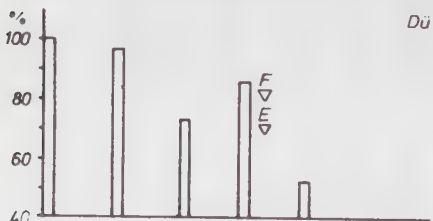


Fortsetzung Gruppe II

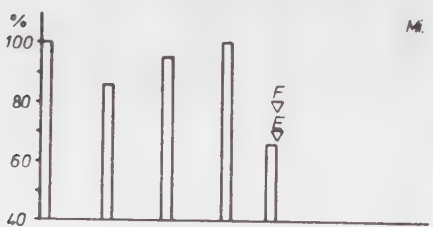
Ak.



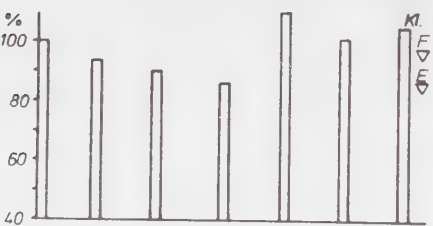
Dü



Mi



Ki



Ri

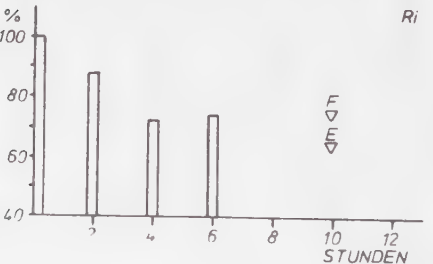
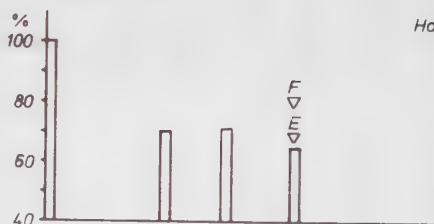


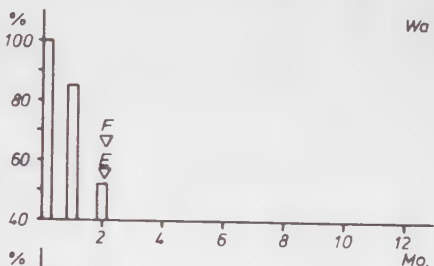
Abb. 14

Gruppe III

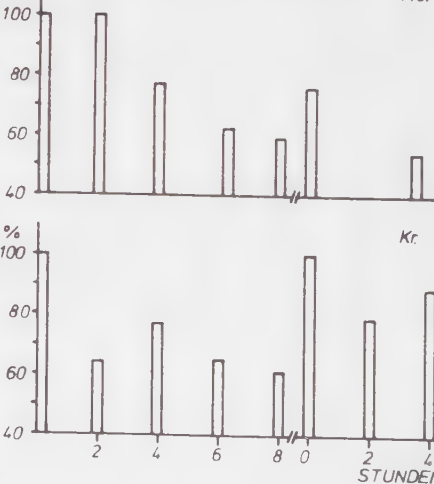
Ho



Wa

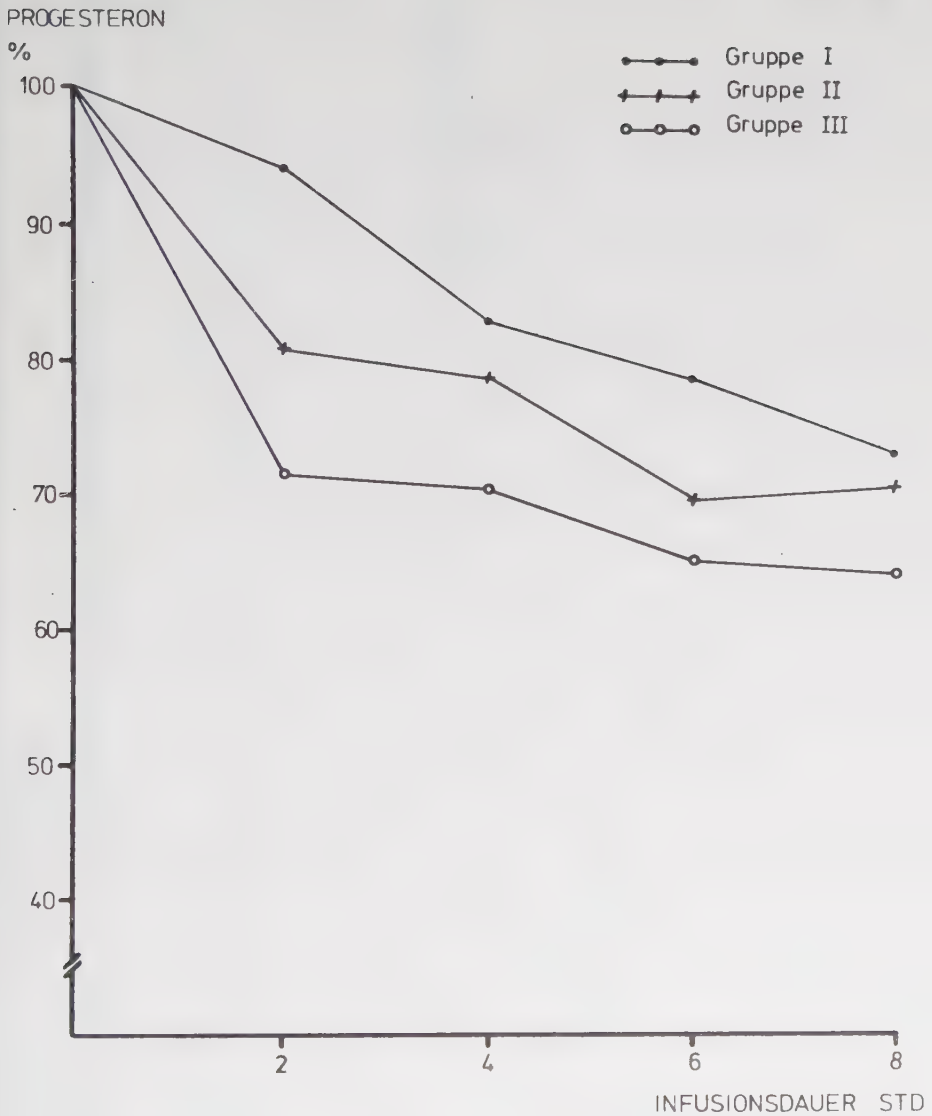


Kr



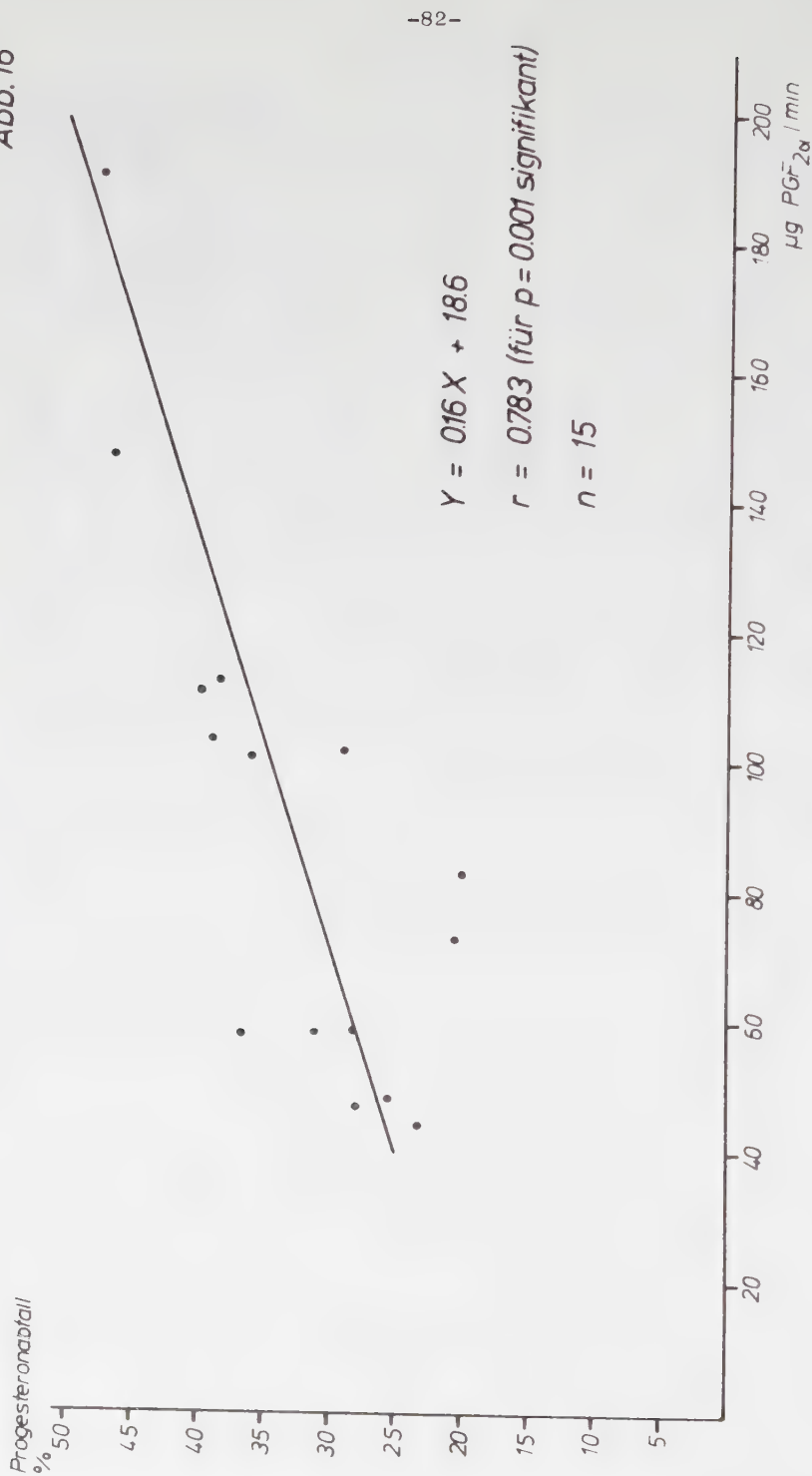
E = Infusionsende
F = Ausstoßung des Uterusinhalts
F₂₁ = Ausstoßung nach 21 Stunden
F₁₉ = Ausstoßung nach 19 Stunden

Abb. 15



Prozentualer Progesteronabfall (Mittelwerte) der Gruppen
I - III während der $PGF_{2\alpha}$ -Infusion

Abb. 16



Beziehung zwischen der verabreichten mittleren Prostaglandindosis und dem prozentualen Progesteronabfall bei Infusionsende

DANKVERMERK

Herrn Prof. Dr. Josef Zander bin ich für die Überlassung des Themas, für die wissenschaftliche Anleitung, sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Labor zu Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich Herrn Dr. H. Mickan für zahlreiche Ratschläge und wertvolle Diskussionen.

Herrn Dr. H. Rjosk danke ich für die Durchführung der LH-Bestimmungen im Plasma.

LEBENS LAUF

Dieter Berg	geb. 28.6.1945 in München, als Sohn des Dr. Frank Berg, der- zeit o. Professor für Brauereian- lagen an der TU München und sei- ner Ehefrau Elisabeth Berg, gebo- rene Greck;
Schulbildung	Stieler Volksschule München von 1951 bis 1955 Schiller Gymnasium Ludwigsburg von 1955 bis 1958 Dom Gymnasium Freising von 1958 bis 1965 Abschluß: Reifeprüfung 1965
Bundeswehr	1965 bis 1967
Studium	Ludwig-Maximilian-Universität München, Studium der Medizin von 1967 bis 1973 (11 Sem.) Abschluß: Staatsexamen Juni 1973
Bisherige Tätigkeit	seit Oktober 1973 Medizinal- assistent am Kreis- und Stadt- krankenhaus Freising



